

**ZUR FRAGE DER IMMUNREAKTIONEN BEIM RIND
NACH THERAPEUTISCHER APPLIKATION VON HCG**

Hang-Poung Fung

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551927_0097

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Lehrstuhl : Prof. Dr. W. Leidl

und

aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infek-
tions- und Seuchenmedizin des Fachbereichs Tiermedizin
der Universität München

Vorstand : Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Anleitung von Prof. Dr. W. Leidl
und Prof. Dr. H. Buschmann

ZUR FRAGE DER IMMUNREAKTIONEN BEIM RIND
NACH THERAPEUTISCHER APPLIKATION VON HCG

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin
der Ludwig - Maximilians - Universität München

von

Hang-Poung Fung
aus Kaung Chu

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof.Dr.H.Kräußlich

Referent: Prof.Dr.W.Leidl

Korreferent: Prof.Dr.H.G.Buschmann

Tag der Promotion: 27.Juli 1979



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. GRUNDLAGEN	2
2.1. Begriffsbestimmung und Bildungsstätten	2
2.2. Molekülaufbau	5
2.3. Wirkung	8
2.4. Therapeutischer Einsatz	11
2.5. Biotechnischer Einsatz	14
3. PROBLEMATIK DER HCG-APPLIKATION AUS IMMUNOLOGISCHER SICHT	15
3.1. Wesen und Phänomene	15
3.2. Immunreaktionen gegen HCG	19
3.2.1. Antigene Eigenschaften des HCG-Moleküles	22
3.2.2. Humorale Immunantwort	24
3.2.3. Zelluläre Immunantwort	29
4. WIRKUNGSRELATIONEN ZWISCHEN HCG UND IMMUNABWEHR	30
4.1. Grundlagen	30
4.2. Neutralisation der biologischen Wirksamkeit	35
4.3. Immunpathogene Folgen	38

	Seite
4.4.	Keine Beeinflussung 40
5.	BEDEUTUNG VON BEGLEIT- UND HILFS- STOFFEN IN HCG-PRÄPARATEN ALS ANTI- GENE BZW. HAPTENE 43
6.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN 47
6.1.	Material und Methoden 47
6.1.1.	Verwendete Hormone und Chemikalien 47
6.1.2.	Kaninchenversuch 48
6.1.2.1.	Immunisierungsschema 48
6.1.2.2.	Blutentnahmen 49
6.1.2.3.	Serumgewinnung 50
6.1.3.	Rinderversuche 51
6.1.3.1.	Felduntersuchung 51
6.1.3.2.	Immunisierungsversuch 53
6.1.3.2.1.	Versuchstiere 53
6.1.4.	Nachweismethoden für Antikörper 54
6.1.4.1.	In vitro Test 54
6.1.4.1.1.	Passive Hämagglutination 54
6.1.4.1.1.1.	Herstellung der Erythrozytensuspension 54
6.1.4.1.1.2.	Koppelung von HCG an die Erythrozyten 55
6.1.4.1.1.3.	Durchführung des Testes 56
6.1.4.2.	In vivo Tests 57

	Seite
6.1.4.2.1.	Intrakutantest in der Schwanzfalte 57
6.1.4.2.2.	Intrakutantest an der Schulterhaut 58
6.2.	ERGEBNISSE 60
6.2.1.	Kaninchenversuch 60
6.2.2.	Rinderversuche 63
6.2.2.1.	Felduntersuchung 63
6.2.2.2.	Immunisierungsversuch 65
6.2.2.3.	Intrakutantest in der Schwanzfalte 66
6.2.2.4.	Intrakutantest an der Schulterhaut 70
6.2.3.	Statistische Auswertung 79
7.	DISKUSSION 80
8.	ZUSAMMENFASSUNG 87
9.	LITERATURVERZEICHNIS 90

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Der Einsatz von humanem Choriongonadotropin (HCG) in der Therapie funktioneller Fortpflanzungsstörungen sowie unter biotechnischen Aspekten zur Steuerung der Fortpflanzungsfunktionen hat in der Veterinärmedizin zweifellos zu großen Erfolgen geführt. Mit dem steigenden Verbrauch von gonadotropen Hormonpräparaten sind aber auch mögliche Komplikationen und Schäden auf Grund immunologischer Folgereaktionen vermehrt zu beachten. Da HCG für alle Säuger außer Primaten ein körperfremdes Glykoprotein darstellt und damit eine Antikörper- bzw. Immunzellbildung nach parenteraler Applikation nicht ausgeschlossen werden kann, besteht einmal die Gefahr der Neutralisation der Hormonwirkung und/oder zum anderen die der Ausbildung allergischer Reaktionen.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Untersuchungen über eine gezielte Antikörperbildung beim Versuchstier, liegen zum Problem humoraler bzw. zellulärer Immunreaktionen nach therapeutischer Applikation von HCG jedoch nur wenige Befunde vor. Aufgabe vorliegender Arbeit soll sein, zu untersuchen, ob beim Rind humanes Choriongonadotropin bei klinischer Anwendung als Antigen wirkt und bei therapeutischem Einsatz die Induktion einer spezifischen humoralen Immunantwort auszulösen vermag.

2. GRUNDLAGEN

2.1. BEGRIFFSBESTIMMUNG UND BILDUNGSSTÄTTEN

ASCHHEIM und ZONDEK (1927) fanden erstmals im Serum und Urin schwangerer Frauen das Choriongonadotropin (HCG = human chorionic gonadotrophin). Auf Grund seiner Wirkung auf das Ovarienwachstum und die Corpus luteum Bildung in noch unreifen Mäusen wurde diesem Glykoproteinhormon eine hypophysäre Herkunft zugeschrieben. Jegliche Zweifel bezüglich der Bildungsstätte des Hormons während der Schwangerschaft konnten jedoch beseitigt werden, als einige Jahre später mit Hilfe der Gewebekulturtechnik der Nachweis erbracht werden konnte, daß die Bildung von HCG in den Zellen der Plazenta erfolgt (GEY et al., 1938). Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten gelang es allerdings nicht, Beweise für eine mögliche Existenz weiterer, den Hypophysenhormonen ähnlichen Substanzen in Plazentaextrakten zu finden (DICZFALUSY und TROEN, 1961). Seit aber beim Menschen ein weiteres Plazentahormon bekannt wurde, wegen seiner prolaktinähnlichen Wirkung als "human placental lactogen" (HPL) bezeichnet (JOSIMOVICH und MacLAREN, 1962), wuchs das Interesse für die Plazenta, im Sinne eines endokrinen Organes und erfuhr durch die Fortschritte der Proteinchemie einen erneuten Stimulus. Neue und feinere Methoden zur Reinigung und Analyse von Pro-

teinen erleichterten auf der einen Seite die exakte Untersuchung der Hormone, während andererseits mit Hilfe immunologischer Techniken die Identifizierung des Plazentazelltypes, der für Synthese und Sekretion der verschiedenen Hormone verantwortlich ist, ermöglicht wurde (FRIESEN, 1973).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß in der frühen Schwangerschaft gleichzeitig mit dem schnellen Anstieg der HCG-Konzentration ein vermehrtes Auftreten von Langhanszellen im Gewebe der Plazenta festzustellen war (TENNEY und PARKER, 1937). Außerdem fiel mit dem Hormongehalt im zweiten Drittel der Schwangerschaft auch die Zahl der Zytotrophoblasten, während Synzytiotrophoblasten vermehrt auftraten. Histochemische Studien des plazentaren Gewebes, die einen hohen Glykoproteingehalt der Zytotrophoblasten ergaben, wiesen ebenfalls daraufhin, daß HCG in diesem Zelltyp gebildet wird. (WEBER, 1963). Erst mit Hilfe der direkten (MIDGLEY und PIERCE, 1962) sowie indirekten Immunofluoreszenztechnik (LEZNOFF und DAVIS, 1963) und elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte diese These widerlegt und gleichzeitig demonstriert werden, daß die HCG-Sekretion über die Synzytiotrophoblasten der Plazenta erfolgt (FRIESEN, 1973).

Die Synthese und Sekretion von humanem Choriongonadotro-

pin erfolgt demnach unter physiologischen Bedingungen in der Plazenta und die Hormonkonzentrationen können im peripheren Blut sowie im Urin bereits kurze Zeit nach der Befruchtung bestimmt werden. Abgesehen vom Auftreten dieses Glykoproteins bei Patienten mit Choriokarzinomen u.ä. (PATILLO et al., 1971) wurde HCG prinzipiell als ein "Hormon der Schwangerschaft" bezeichnet. Neuerdings weisen jedoch einige Untersuchungen auf die Anwesenheit HCG-ähnlicher Substanzen im testikulären Gewebe, Hypophysen- und Harnextrakten, sowie im Medium verschiedener Bakterienpopulationen hin, die unter anderem für die spezifischen HCG-Bestimmungsmethoden eine nicht unbedeutende Problematik mit sich bringen könnten (MATSUURA et al., 1978).

2.2. MOLEKÜLAUFBAU

Humanes Choriongonadotropin, wie zahlreiche andere Hormone, Enzyme und Serumproteine ein Glykoprotein, gehört der Gruppe der zusammengesetzten Proteine an. Das Strukturprinzip der Glykoproteine, die einen Kohlenhydratan- teil als prosthetische Gruppe enthalten, besteht darin, daß eine, mehrere oder zahlreiche Kohlenhydratgruppen durch hauptvalenzartige Bindung mit dem Proteinanteil verknüpft sind (BUDDECKE, 1971).

Das HCG-Molekül besteht aus zwei verschiedenen, nicht kovalent gebundenen Polypeptidketten (SWAMINATHAN und BAHL, 1970; MORGAN und CANFIELD, 1971), der Nomenklatur anderer Glykoproteinhormone entsprechend als α - bzw. β -Untereinheiten benannt, deren Verknüpfung mit den entsprechenden Kohlenhydratseitenketten über eine kovalente Bindung erfolgt (BAHL, 1969). Die Primärstruktur von HCG- α , d.h. die für ein Protein charakteristische und genetisch festgelegte Sequenz der Aminosäuren, ist der anderer α -Untereinheiten menschlicher Glykoproteine sowie ovinem bzw. bovinem luteinisierendem Hormon (LH) und Thyreoidea stimulierendem Hormon (TSH) nahezu identisch (MORGAN et al., 1973). Im Gegensatz dazu zeigt die β -Untereinheit zwar eine ähnliche, dennoch unterschiedliche Aminosäuresequenz gegenüber humanen Glyko-

proteinhormonen sowie ovinem bzw. bovinem LH- β und TSH- β (MORGAN et al., 1973). So stimmen beispielsweise 80 % der ersten 115 Aminosäurereste von HCG- β mit denen der β -Kette von humanem luteinisierenden Hormon (hLH) überein (SHOME und PARLOW, 1973), während die β -Untereinheit von HCG am sog. C-terminalen Kettenende jedoch 30 Aminosäurereste mehr aufweist (ROSS, 1977). Der Kohlenhydratanteil, der aus zwei verschiedenen Seitenketten - kovalent mit den α - bzw. β -Untereinheiten verknüpft - besteht, enthält vorwiegend glykosidisch gebundene Sialinsäure (Neuraminsäure), Fucose, Galaktose, Mannose, N-acetylglukosamin und Galaktosamin in verschiedenen Kombinationen (MORGAN et al., 1973; GOVERDE et al., 1968; MORI, 1970; BAHL, 1969). Zusätzlich besitzt die β -Kette von HCG noch drei Oligosaccharidketten (MORGAN et al., 1973).

Durch die Primärstruktur wird zwar die Grundsubstanz des Proteohormonmoleküles erfaßt, der eigentliche räumliche Bauplan, der wesentliche Bedeutung für die Hormonfunktion besitzt, kann jedoch erst durch eine Beschreibung der Sekundär- bzw. Tertiärstruktur sowie Quartärstruktur wiedergegeben werden (DÖCKE, 1975). Neuere Untersuchungen zeigen auch, daß die biologische Aktivität des Choriongonadotropins von reversiblen Tertiär- oder Quartärstrukturkonfigurationen des intakten HCG-

Moleküles abhängig ist und der Kohlenhydratanteil weder für die Ausbildung noch Erhaltung dieser Fähigkeit, eine obligatorische Rolle zu spielen scheint (ROSS, 1977).

2.3. WIRKUNG

Die physiologische Aufgabe von humanem Choriongonadotropin liegt in der Aufrechterhaltung der Gelbkörperfunktion während der frühen Schwangerschaft (FRIESEN, 1973), d.h. in der Verlängerung der Lebensdauer des funktionellen Corpus luteum und damit in der Stimulierung der Progesteronsynthese (SHERWOOD und McSHAN, 1977; TURNER und BAGNARA, 1971). Hormonprofile zeigen, daß die HCG-Konzentrationen zu Beginn der Gravidität kontinuierlich ansteigen, ihr Maximum um die 8. Woche (HIERHOLZER et al., 1977) und ihren Tiefpunkt nach 18 Wochen erreichen (BRAUNSTEIN et al., 1976). Demgegenüber steigen die HPL-Werte langsam aber gleichmäßig bis zum Ende der Gravidität an. Möglicherweise übernimmt dieses Hormon die Funktion des nach der 12. Woche stark abfallenden HCG, da etwa zu diesem Zeitpunkt auch die Umstellung der Progesteronsynthese vom Corpus luteum auf die Plazenta erfolgt (HIERHOLZER et al., 1977).

Die jeweiligen endokrinen Faktoren, die Wachstum sowie Sekretion des Corpus luteum fördern und dementsprechend als luteotrop bezeichnet werden (DÖCKE, 1975), sind in der Regel je nach Spezies verschieden (HIERHOLZER et al., 1977). Obwohl die Bildung von HCG nur bei Menschen und Primaten erfolgt, konnte jedoch auch bei anderen Spezies

nach Applikation dieses Hormones eine luteotrope Wirkung festgestellt werden. In zahlreichen Versuchen wurde gezeigt, daß HCG-Gaben auch beim Rind zu einer Verlängerung der Lebensdauer des funktionellen Corpus luteum (DONALDSON und HANSEL, 1965; WILTBANK et al., 1961; SCHOMBERG et al., 1967) und einer erhöhten Progesteronsynthese der Luteinzellen sowohl in vitro (SAVARD et al., 1965; MASON et al., 1962) als auch in vivo (SCHOMBERG et al., 1967; VEENHUIZEN et al., 1972; MORRIS et al., 1976) führen können.

Die Wirkung von humanem Choriongonadotropin entspricht, sicherlich durch die große Strukturähnlichkeit bedingt, weitgehend der des hypophysären luteinisierenden Hormones (SHERWOOD und McSHAN, 1977; DÖCKE, 1975). Neben seinem stimulierenden Effekt auf die interstitiellen Zellen der Gonaden, sowohl des weiblichen als auch des männlichen Tieres (SHERWOOD und McSHAN, 1977; TURNER und BAGNARA, 1971), ließen sich in HCG-Präparaten aber noch andere biologische Aktivitäten nachweisen (BIRKEN und CANFIELD, 1978). Dabei muß zwischen den Hormonpräparaten für den klinischen Gebrauch, die direkt aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen werden und eine Vielzahl an Verunreinigungen enthalten und hochgereinigten HCG-Präparationen differenziert werden, da bestimmte Aktivitäten auf Verunreinigungen und nicht auf der biologischen

Wirkung des HCG-Moleküles selbst basieren. Während eine TSH- und FSH-ähnliche Wirkung von HCG auch in hochgereinigten Präparaten nachgewiesen werden konnte, scheinen immunsuppressive Effekte sowie die Beeinflussung der Porphyrinsynthese nicht an das HCG-Molekül selbst gebunden zu sein (BIRKEN und CANFIELD, 1978).

2.4. THERAPEUTISCHER EINSATZ

Während aus zuchthygienischen sowie ökonomischen Gründen bei Vartertieren, die an Ausfallserscheinungen der Gonadotropin- und Steroidsekretion leiden, nur selten eine Therapie erfolgt, kommen beim weiblichen Tier vermehrt gonadotrope Hormone bzw. Sexualsteroido zum Einsatz, da die zyklischen Abläufe der Sexualfunktionen größere Störanfälligkeiten bedingen (DÖCKE, 1975).

Grundsätzlich sollten jedoch beim Einsatz von Hormonen folgende Gesichtspunkte beachtet werden:

- die kausale Regulierung muß der Therapie mit Hormonen gleichlaufen bzw. vorangehen
- vor der Anwendung von Hormonen muß eine eingehende Diagnostik erfolgen
- Hormone sollten immer in vorsichtiger Dosierung angewendet werden
- zwischen primären und sekundären Insuffizienzen der Ovarien sollte differenziert werden (DÖCKE, 1975).

Humanes Choriongonadotropin, kombiniert mit anderen Hormonen oder als reines HCG-Präparat, kommt vorrangig bei der Therapie funktioneller Fortpflanzungsstörungen zur Anwendung, die in folgendem Übersichtsschema, bei dem nur auf die Nutztierarten eingegangen wird, zusammengefaßt sind.

FUNKTIONELLE STÖRUNGEN DER OVARFUNKTION, BEI DENEN HCG-
PRÄPARATIONEN ZUR ANWENDUNG KOMMEN KÖNNEN:

modifiziert nach DÖCKE, 1975

- | | |
|---------|--|
| RIND | - Brunstintensitätsstörungen |
| | - Postpartale Anöstrie |
| | - Anöstrie des Jungrindes |
| | - Periodizitätsstörungen des Zyklus |
| | - Ovulationsanomalien |
| | - Großzystische Entartung der Ovarien
(Follikel-Theka-, Follikel-Lutein-
und Corpus-luteum-Zysten) |
| SCHWEIN | - Anöstrie |
| | - Großzystische Entartung der Ovarien |
| PFERD | - Rosse bei ausbleibender Ovulation |
| | - Übersteigerte Brunst |

Für die Behandlung der Ovarialzysten des Rindes kann
beispielsweise - neben der Applikation von syntheti-
schen "LH-releasing-factors" - die HCG-Substitution
als Methode der Wahl angesehen werden (GARVERICK et

al., 1976), wobei für den Behandlungserfolg offensichtlich ein kurzfristiger, aber hoher HCG-Spiegel notwendig ist (GÜNZLER und HUBER, 1967). Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht geklärt. Die lange Zeit vertretene These, daß es durch einen Luteinisierungseffekt auf die Granulosazellen zur Bildung eines funktionsfähigen Corpus luteum, d.h. also zu einer Transformation der Zyste, käme und daraus dann wieder ein Regelzyklus resultieren würde (KORNDÖRFER und SCHMID-LINDNER, 1975) wird nicht mehr allgemein akzeptiert. Es könnte auch, ähnlich wie nach gonadotropin releasing hormone (Gn-RH)-Applikation (BERCHTHOLD et al., 1978) zu einer Ovulationsinduktion neben der Zyste und damit zu einem Wiederanlaufen eines physiologischen Zyklus kommen.

2.5. BIOTECHNISCHER EINSATZ

Humanes Choriongonadotropin wird auch unter biotechnischen Aspekten zur Steuerung der Fortpflanzungsfunktionen eingesetzt. Von Bedeutung ist dies beim Schwein zur Brunst- bzw. Zyklüssynchronisation sowie zur Superovulation. Im ersten Fall dient HCG zur genaueren Determinierung des Ovulationszeitpunktes im Anschluß an eine mehrtägige Gestagenapplikation. Dies Verfahren kann auch, wenn kurz nach Ende der Gestagenverabreichung zusätzlich PMSG appliziert wird, zur Auslösung einer Superovulation dienen (STOLLA, 1976; STIDL, 1979). Beim Kaninchen kann, außer während einer Gravidität oder Pseudogravidität, jederzeit durch HCG eine Ovulation ausgelöst werden, z.B. zum Zweck der künstlichen Besamung oder zur Synchronisation von Rezipienten beim Embryotransfer (MICHELMANN und PAUFLER, 1974; HAFEZ, 1964). In Verbindung mit PMSG wird HCG bei Kaninchen und Maus auch zur Auslösung einer Superovulation eingesetzt (HAFEZ, 1964; EDWARDS und FOWLER, 1959).

3. PROBLEMATIK DER HCG-APPLIKATION AUS IMMUNOLOGISCHER SICHT

3.1. WESEN UND PHÄNOMENE

Der massive Einsatz von Hormonpräparaten in der Therapie funktioneller Fortpflanzungsstörungen sowie zur Steuerung der Fortpflanzungsfunktionen hat in den letzten Jahren unbestritten zu großen Erfolgen geführt. Wie aber jeder Eingriff in die Integrität des Organismus neben der gewünschten Wirkung schädliche Nebenwirkungen haben kann, sind mit dem zunehmenden Verbrauch von Hormonpräparaten auch die Berichte über mögliche Komplikationen und Schäden als Folge ihrer Anwendung zahlreicher geworden. Da HCG für den Säugetierorganismus (ausgenommen Primaten) ein körperfremdes Glykoprotein darstellt und damit wahrscheinlich als antigene Substanz fungiert, wurden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um die immunologischen Probleme, d.h. eine mögliche Antikörper- bzw. Immunzellbildung nach HCG-Applikation abzuklären.

Nach ROLLE und MAYR (1978) versteht man unter Antigenen hochmolekulare organische Verbindungen, die einerseits in der Lage sind, im Wirbeltierorganismus eine Antikörperbildung anzuregen und zum anderen die Fähigkeit

haben, mit den gebildeten Antikörpern spezifisch zu reagieren. Man bezeichnet solche Antigene als Vollantigene (komplette Antigene) oder auch als Immunogene, da sie im Organismus Immunisierungsvorgänge auslösen. Dabei muß allerdings beachtet werden, daß sich manche Antigene bezüglich ihrer Wirksamkeit in Abhängigkeit von Molekulargewicht, Molekülkonfiguration und -Größe, sowie Anzahl der freien Gruppen, Löslichkeitsgrad und Verweildauer im Blut bzw. Ausscheidungsgeschwindigkeit unterscheiden. Auch wenn man davon ausgeht, daß das HCG-Molekül antigen bzw. immunogen wirkt, hängt die Bildung von Antikörpern nicht nur von deren Molekulargewicht und strukturem Aufbau ab. Von großer Bedeutung für eine erfolgreiche Immunreaktion ist auch die Reaktionsfähigkeit des Wirtstieres, die individuellen und tierartlichen Schwankungen unterliegt. Ein Organismus kann die Applikation eines Antigens nur dann mit einer Immunreaktion beantworten, wenn er die Substanz als körperfremd erkennt, das heißt über ein präzise arbeitendes immunologisches Erkennungssystem verfügt. Vieles spricht dafür, daß sowohl die Fähigkeit, eine bestimmte determinante Gruppe zu "erkennen", als auch auf eine determinante Gruppe, die an ein bestimmtes Trägermolekül gebunden ist, "zu antworten", genetisch kontrolliert sein könnte (HUMPHREY und WHITE, 1972). Außerdem müssen noch Art, Menge und Eintrittsweg des

HCG-Moleküles beachtet werden, da diese Parameter für die Art der Gewebe- bzw. Immunreaktion eine nicht unbedeutende Rolle spielen (YAMAUCHI, 1970; LEATHEM, 1947; FIGON et al., 1960). Neben der Art und Dosis des verwendeten Antigens bzw. Hormonpräparates besitzen auch Zusätze und Adjuvantien einen Einfluß auf die Konzentration und Affinität der gebildeten Antikörper (BUSCHMANN, 1973). Ferner wird die Qualität der gebildeten Antikörper durch altersbedingte Einflüsse verändert, da das Abwehrsystem, wie die übrigen Organsysteme auch, einer Reifung und Alterung im Verlauf der Ontogenese unterliegt (BUSCHMANN, 1970). Bei einer Therapie mit Hormonen, die ja vorrangig das weibliche Tier betrifft, darf auch der Einfluß des Geschlechtes auf Immunreaktionen nicht unbeachtet bleiben. Bei Untersuchungen über die Ursachen der Variabilität der Immunantwort fiel immer wieder auf, daß weibliche Tiere ihren männlichen Altersgenossen zwar geringgradig, aber signifikant überlegen waren (BUSCHMANN, 1974). Beispielsweise können weibliche Tiere Allotransplantate schneller abstoßen als männliche (GRAFF et al., 1969; KONGSHAVEN und BLISS, 1969) und auch sowohl nach primärem, wie sekundärem Antigenkontakt höhere Antikörperspiegel erreichen (BUTTERWORTH et al., 1967; ROWLEY und MacKAY, 1969). Eine mögliche Immunantwort nach Applikation von humanem Choriongonadotropin mit all ihren Folgen wird also von zahl-

reichen Parametern beeinflusst, so daß sicherlich eine generelle Abklärung der immunologischen Problematik große Schwierigkeiten mit sich bringt.

3.2. IMMUNREAKTIONEN GEGEN HCG

Grundsätzlich kann eine Applikation von humanem Choriongonadotropin zur Aktivierung der Abwehrmechanismen des tierischen Organismus führen (PIGON et al., 1960; YAMAUCHI, 1970; Al-KAWAWI et al., 1974; GLASS und MROUEH, 1967; LEATHEM, 1947; RAO und SHAHANI, 1961; MATSUURA et al., 1978). Bei dem Versuch, die immunologische Problematik der HCG-Therapie zu erfassen, steht die spezifische Immunantwort, also die Veränderungen in der Reaktivität des Organismus, die auf das HCG-Molekül bzw. mit ihm fast identische Substanzen beschränkt sind, im Vordergrund des Interesses.

Ein Literaturvergleich über die Immunogenität von humanem Choriongonadotropin und den resultierenden Immunreaktionen wird jedoch durch verschiedene Zielsetzungen der Forschungsarbeiten erschwert. Die guten Ergebnisse, die mit immunologischen Nachweismethoden von HCG bei der schwangeren Frau erzielt wurden (WIDE und GEMZELL, 1960), führten zur Entwicklung von Testmethoden mit immer größerer Empfindlichkeit und Spezifität, wie beispielsweise radioimmunologischen Techniken, die den Nachweis kleinster Konzentrationen des Hormones gestatten (HIERHOLZER et al., 1977; TYREY et al., 1974). Da hierbei die Produktion eines spezifischen Antiserums

gegen HCG die Voraussetzung zu einer Identifizierung und quantitativen Bestimmung darstellt, müssen dementsprechend hochgereinigte Hormonpräparationen zur Verfügung stehen. Damit liegt hier die Zielsetzung in der Gewinnung möglichst hochtitriger und spezifischer Immunseren gegen humanes Choriongonadotropin und damit in der Verbesserung und Kommerzialisierung der immunologischen Nachweismethoden für HCG. Demgegenüber stehen jedoch die Bemühungen, bei therapeutischem Einsatz von humanem Choriongonadotropin jegliche Immunreaktion zu verhindern. Während zur Gewinnung wirksamer Immunseren die Antigenität des HCG-Moleküles durch Koppelung z.B. an Proteine oder Zugabe von Adjuvantien verstärkt werden soll, wird im Rahmen der Hormontherapie alles versucht, die Induktion einer Antikörper- oder Immunzellbildung nach HCG-Applikation zu vermeiden, um immunpathogenen Folgen und/oder Wirkungsverlusten des Hormones entgegenzuwirken.

Es ist deshalb verständlich, daß Immunreaktionen gegen HCG von der jeweiligen Zielstellung und damit von der Applikationsart und -häufigkeit, Dosierung, Zugabe von Adjuvantien usw. abhängig sein werden. Voraussetzung für eine Untersuchung der

immunologischen Reaktionen ist aber erst die Abklärung der antigenen bzw. immunogenen Eigenschaften des HCG-Moleküles selbst.

3.2.1. ANTIGENE EIGENSCHAFTEN DES HCG-MOLEKÜLES

In früheren Versuchen wurde empirisch gefunden, daß sowohl Proteine als auch Polysaccharide und dementsprechend auch Glykoproteine gute Antigene darstellen (KABAT, 1971), wobei die Differenzen in der Zusammensetzung, Konfiguration und Konformation der Substanzen zu analogen Strukturen im Empfänger, für ihre Antigenität ausschlaggebend sind (von FELLEBERG, 1978). Bei der Bezeichnung "Antigen" muß jedoch zwischen Vollantigenen bzw. kompletten Antigenen (s. 3.1.) und Halbantigenen, entsprechend als inkomplette Antigene oder Haptene bezeichnet, differenziert werden (ROLLE und MAYR, 1978). Derartige Substanzen können durch Koppelung an hochmolekulare Trägerproteine in der Regel die Eigenschaften von Vollantigenen bzw. Immunogenen erlangen, d.h. sie lösen dann ebenfalls im Organismus Immunisierungsvorgänge aus.

Stimuliert durch die Beobachtung, daß bei wiederholter TSH-Applikation bei Tieren sowohl ein Aktivitätsabfall dieses Hormones, als auch eine TSH-inaktivierende Substanz nachgewiesen werden konnte (COLLIP und ANDERSON, 1934), wurden zahlreiche Untersuchungen über antigene Eigenschaften von HCG durchgeführt. Da humanes Choriongonadotropin für die verschiedenen Tierarten ein kör-

per fremdes Glykoprotein mit hohem Molekulargewicht - die Werte schwanken zwischen 40.000 und 100.000 (MORGAN et al., 1973) - darstellt, lag der Verdacht einer sog. "Antihormonbildung" nahe (LEATHEM, 1947; LEATHEM und BRADBURY, 1949). Während anfangs die Meinungen über die Antigenität des HCG-Moleküles noch divergierten, werden in neuerer Literatur sowohl das intakte Molekül und seine freien α - und β -Untereinheiten (ROSS, 1977; DONINI et al., 1975; 1976; LUNENFELD et al., 1962), als auch natürliche Fragmente von HCG als antigen bezeichnet (ROSS, 1977). Darüberhinaus gelang mit Hilfe der genauen Kenntnis der Aminosäuresequenz von HCG die Herstellung synthetischer kohlenhydratfreier Replikate von Fragmenten der β -Untereinheit, die nach Koppelung an Trägerprotein ebenfalls immunogen waren (MATSUURA et al., 1978). Voraussetzung für diese Arbeiten war die Untersuchung der antigenen Determinanten von humanem Choriongonadotropin. Während in einigen Fällen der Kohlenhydratanteil die serologische Spezifität von Glykoproteinen zu bestimmen scheint (KABAT, 1971), bleiben die antigenen Eigenschaften des HCG-Moleküls nach Abspaltung der Sialinsäure oder anderer Bestandteile der Polysaccharidketten erhalten (MORI, 1970; MERZ et al., 1974; van HALL et al., 1971). Demgegenüber resultieren Veränderungen der Tertiärstruktur des Moleküles oder seiner Untereinheiten in einem kompletten Verlust der antigenen Wirkung (ROSS, 1977).

3.2.2. HUMORALE IMMUNANTWORT

Das humorale Immunsystem beruht auf der Bildung spezifischer Antikörper (ROLLE und MAYR, 1978). Die Antikörpermoleküle - biochemisch als Immunglobuline bezeichnet - sind aus mehreren Peptidketten aufgebaut und werden auf Grund der Natur des konstanten Teiles der H- (Heavy-) Ketten in 5 Klassen aufgeteilt: IgG, IgA, IgM, IgD und IgE. Ihre Bildung erfolgt in den Plasmazellen und deren Vorläufern und verläuft entsprechend der Kompliziertheit der beteiligten zellulären Mechanismen, die einer Stimulierung mit anschließender Proliferation und Differenzierung unterliegen, in mehreren Phasen (ROLLE und MAYR, 1978). Auf Grund des Phänomenes der immunologischen Gedächtnisreaktion, d.h. des Erinnerungsvermögens des Immunsystems an einen ersten Antigenkontakt, reagiert der in Bezug auf dieses Antigen sensibilisierte Organismus nach einer zweiten oder wiederholten Infektion des gleichen Antigens i.d.R. mit einer schnelleren und verstärkten Immunantwort. Geht man davon aus, daß HCG für die verschiedenen Tierarten eine antigene Substanz darstellt, besteht dementsprechend nach ein- oder mehrmaliger Applikation die Möglichkeit der Immunitätsentwicklung und damit sowohl die Gefahr eines Wirkungsverlustes des Hormones, als auch möglicher Komplikationen durch

die Entstehung immunpathogener Reaktionen.

Bereits in den frühen Arbeiten wird über die Bildung "gewisser Substanzen" - verschiedentlich bereits als Antihormone bezeichnet - nach wiederholter Hormonapplikation bei Mensch und Tier berichtet (LEATHEM, 1947; LEATHEM, 1944; COLE et al., 1957; LEATHEM, 1946; COLLIP und ANDERSON, 1934; LEATHEM und BRADBURY, 1949), die bald als hormonspezifische Antikörper klassifiziert werden konnten (RAO und SHAHANI, 1961; YAMAUCHI, 1970). Zur Bestimmung der Serumantikörper nach Sensibilisierung mit humanem Choriongonadotropin wurden verschiedene in vitro-Nachweismethoden herangezogen, wie Präzipitation und Immunodiffusion (McKEAN, 1960; RAO und SHAHANI, 1961; LUNENFELD et al., 1962; TAYMOR et al., 1963), Hämagglutination (LUNENFELD et al., 1962; WILE und GEMZELL, 1960; KATAOKA, 1964; KATAOKA et al., 1965), Komplementbindungsreaktion (BRODY und CARLSTRÖM, 1961) und Radioimmunoassay (AL-KAPAWI et al., 1974; ROSS, 1977; VAITUKAITIS et al., 1973). Bei einem Literaturvergleich muß aber prinzipiell zwischen experimentellen Arbeiten, beispielsweise zur Herstellung spezifischer Immunsereen, Studien zu Kreuzreaktionen und zur Immunchemie bzw. Histochemie und Untersuchungen zur Antikörperbildung nach therapeutischer Applikation von HCG unterschieden werden, da neben Dosierung und Applika-

tionshäufigkeit des Hormones auch Zusätze und Adjuvantien einen Einfluß auf Konzentration und Affinität der gebildeten Antikörper ausüben (ROLLE und MAYR, 1978). Weiter muß zwischen humanem Choriongonadotropin für den klinischen Gebrauch, das direkt aus dem Harn schwangerer Frauen gewonnen wird und eine Vielzahl an Begleitstoffen enthält und hochgereinigten, bzw. HCG β oder HCG α Präparationen differenziert werden, da Proteinmoleküle verschiedene antigene Determinanten besitzen, von denen jede die Bildung korrespondierender Antikörper auslösen kann. Mit Hilfe des HCG- β -Radioimmunoassays konnte z.B. die Existenz zweier verschiedener Antikörpergruppen demonstriert werden, wobei zwischen Immunglobulinen die LH, HCG und HCG β und solchen, die ausschließlich freie β -Untereinheiten zu binden vermögen, unterschieden werden muß (DOLAIS-KITABGI et al., 1974). Die Autoren schließen aus diesen Ergebnissen, daß bestimmte antigene Determinanten der β -Kette auf Grund der Tertiärstruktur des vollständigen HCG-Moleküles nicht zur Antigen-Antikörper-Reaktion zur Verfügung stehen. Bei einer Rekombination der α -Untereinheiten scheinen jedoch sowohl bei humanem Choriongonadotropin als auch bei anderen Glykoproteinhormonen die Determinanten Gruppen für die reaktiven Gruppen der Antikörper eines Anti-HCG α -Serums erhalten zu sein (ROSS, 1977). Bei einem Literaturvergleich ist demnach auch die Art des applizierten Antigenes bzw. Präparates zu berücksichtigen.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über eine gezielte Antikörperbildung beim Versuchstier - vorrangig bei Kaninchen (HOPKINS und CLAYTON-HOPKINS, 1972; MORI, 1970, NIXON et al., 1971; SCHUURS et al., 1968; MATSUURA et al., 1973) - liegen jedoch kaum wissenschaftlich ausgewertete Befunde zum Problem humoraler Immunreaktionen nach therapeutischer Applikation von HCG - speziell beim Rind - vor. In einigen Veröffentlichungen wird jedoch über eine Antikörperbildung bei dieser Tierspezies sowohl im reinen Experiment, mit entsprechend hohen Hormondosen (NAKAHARA et al., 1961a), als auch nach therapeutischer Applikation von HCG berichtet (NAKAHARA et al., 1961b; NAKAHARA et al., 1961c). Selbst bei subtherapeutischer Dosierung ließ sich in Boosterversuchen mit Hilfe des Hämagglutinationstestes ein schneller, verstärkter Anstieg des Antikörpertiters nachweisen (NAKAHARA et al., 1962). Humorale Immunreaktionen wurden ferner auch nach der Injektion von biologisch inaktivem humanem Choriongonadotropin beschrieben (LEATHEM, 1947; TWOMBLY, 1936), allerdings mit dem Hinweis, daß die Bildung der Antikörper schwächer und die Dauer der Immunität beim Rind deutlich kürzer waren (NAKAHARA et al., 1964). Bei den angesprochenen Versuchen darf aber nicht außer Acht gelassen werden, daß einerseits die geprüften Tierkollektive sehr begrenzt waren und außerdem extrem unterschiedliche Hormondosen sowie Immuni-

sierungsschemata gewählt wurden. In Paralleluntersuchungen mit PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) ließen sich ebenfalls Antikörper nachweisen (YAMAUCHI, 1970; NAKAHARA et al., 1965) während SCHAMS et al. (1978) auch nach wiederholter PMSG-Injektion keine humoralen Immunreaktionen nachweisen konnten. Die mögliche Manifestation von Immunreaktionen scheint beim Rind wahrscheinlich in enger Korrelation mit der gewählten Dosierung sowie Applikationsart und -häufigkeit zu stehen.

3.2.3. ZELLULÄRE IMMUNANTWORT

Nach Antigenkontakt wird in den meisten Fällen neben der humoralen auch die zelluläre Immunität aktiviert. Die Träger der zellgebundenen Immunität stellen die T-Lymphozyten dar, die sich nach dem Kontakt mit einem Antigen in Antigen-sensibilisierte T-Zellen (Effektorzellen) umwandeln und dann als T-Immunzellen bezeichnet werden (ROLLE und MAYR, 1978). Ob nun ein Organismus bevorzugt mit der Produktion von Antikörpern oder der Bildung immunkompetenter Zellen reagiert, hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie Art des Antigens, physikochemische Zusammensetzung, Applikationsart u.s.w. Beispielsweise rufen Antigene, die subkutan appliziert am Injektionsort lange liegenbleiben oder die sich beim Eindringen in den Organismus auf lebenden Zellen befinden, bevorzugt zelluläre Immunreaktionen hervor (VORLAENDER, 1976).

Über die Bedeutung von HCG als ein Antigen, das bevorzugt zelluläre Immunreaktionen hervorruft bzw. über das Auftreten einer zellvermittelten Immunität beim Rind nach Applikation von humanem Choriongonadotropin, liegen jedoch zur Zeit noch keine Untersuchungen vor.

4. WIRKUNGSRELATIONEN ZWISCHEN HCG UND IMMUNABWEHR

4.1. GRUNDLAGEN

Im Rahmen einer Hormontherapie mit humanem Choriongonadotropin kann eine Antikörper- bzw. Immunzellbildung nach parenteraler Applikation beim Tier nicht ausgeschlossen werden. Da Intensität und Art einer Immunreaktion jedoch von zahlreichen Parametern abhängen, muß es aber nicht zwingend zu Folgeerscheinungen, d.h. Wirkungsverlusten oder immunpathogenen Folgen kommen. Prinzipiell ist aber die Gefahr gegeben, daß es bei wiederholter Gabe von HCG auf Grund von immunologischen Reaktionen einerseits zu einer Neutralisation oder Inaktivierung der biologisch aktiven Moleküle und/oder andererseits zu einer spezifischen Überempfindlichkeit mit Krankheitserscheinungen (Allergien) kommen kann.

Beispielsweise können Antikörper biologisch aktive Moleküle durch eine Anzahl verschiedener Mechanismen, die allgemein in zwei Kategorien eingeteilt werden (SELL, 1977), neutralisieren oder inaktivieren. Es besteht einmal die Möglichkeit der direkten Inaktivierung, d.h. der Aktivitätsverlust des Hormonmoleküles wird durch die unmittelbare Reaktion und damit einer Molekülveränderung der biologisch aktiven Substanz hervorgerufen. Demgegenüber

können Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Hormonen, die zwar nicht unmittelbar zu einer Inaktivierung führen, eine schnellere in vivo-Katabolisierung des entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexes und folglich eine Herabsetzung der effektiven Hormonkonzentration bewirken. Dieser Mechanismus wird entsprechend als indirekte Inaktivierung bezeichnet (SELL, 1977). Immunreaktionen gegen biologisch aktive Moleküle führen aber keinesfalls zwingend zu deren Neutralisation oder Inaktivierung (von FELLEBERG, 1978). Da die Auswirkungen der Antikörper auch von den Charakteristika der Antigen-Antikörper-Reaktion, wie Affinität, Avidität und biologische Eigenschaften der Immunglobuline abhängig sind, können Antikörper, die gegen ein Hormon gebildet werden, z.B. in einem Individuum, Inaktivierungen hervorrufen, während sie in anderen Individuen mit dem Hormon zwar reagieren aber keinen Wirkungsverlust herbeiführen (SELL, 1977).

Weiter kann die Hormontherapie mit humanem Choriongonadotropin durch immunpathogene Folgereaktionen, beispielsweise durch allergische Reaktionen, kompliziert werden. ROLLE und MAYR (1978) definierten den Begriff Allergie als eine im Rahmen von Immunvorgängen erworbene, spezifische Überempfindlichkeit eines Organismus, die zu Krankheitserscheinungen führt.

Die durch allergische Reaktionen ausgelösten Gewebeveränderungen können als Abarten von Entzündungsreaktionen betrachtet werden. Folgende Arten der Allergien werden unterschieden:

1. Allergien vom Soforttyp (durch Reagine vermittelt) auch als Allergien im engeren Sinne oder Anaphylaxien bezeichnet;
2. Cytotoxische Überempfindlichkeitsreaktionen (Antikörper zerstören Zellen unter Mitwirkung von Komplement oder durch Aktivierung cytotoxischer Zellen);
3. Überempfindlichkeitsreaktionen, hervorgerufen durch Immunkomplexe;
4. Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (TIZARD, 1977).

Der Genese nach sind davon die anaphylaktoiden Reaktionen abzutrennen, da die Auslösung dieser Vorgänge keine Sensibilisierung bzw. das Vorhandensein von Antikörpern oder Immunzellen erfordert (MAYR und BIBRACK, 1969).

Der Auslösemechanismus einer Allergie, d.h. auch die Sensibilisierung, ist aber neben der Spezifität des Antigens (STEFFEN, 1968; MAYR und BIBRACK, 1969) auch von der unterschiedlichen allergischen Disposition der verschiedenen Tierspezies (MAYR und BIBRACK, 1969) sowie deren individueller Reaktionslage abhängig.

Eine Therapie mit HCG wird sicherlich sowohl durch die Möglichkeit der Neutralisation oder Inaktivierung des Moleküles als auch durch die eventuellen immunpathogenen Folgereaktionen kompliziert. Dennoch darf aber nicht übersehen werden, daß der Erfolg einer HCG-Therapie beim Tier keinesfalls zwingend durch die Ausbildung von Immunreaktionen beeinflußt werden muß. So können Immunreaktionen auf Grund der Ausbildung einer immunologischen Toleranz abgeschwächt verlaufen bzw. ganz ausbleiben. Unter Toleranz versteht man eine spezifische Reaktionsfähigkeit gegenüber einem Antigen; dieser Zustand ist spezifisch für das betreffende Antigen (TIZARD, 1977). Bei der Induktion der Toleranz spielen neben der Immunkompetenz des Organismus, d.h. der Fähigkeit auf Antigenreize zu reagieren (VORLAENDER, 1976), sowohl Art, Dosierung und Applikationsart des Antigens, als auch seine Immunogenität eine wichtige Rolle (HUMPHREY und WHITE, 1972; ROLLE und MAYR, 1978; VORLAENDER, 1976; KABAT, 1971). Beispielsweise kann die Antigendosis für die Ausbildung einer normalen Immunreaktion bzw. für deren teilweise oder völlige Hemmung entscheidend sein. Da sowohl durch sehr geringe, wie auch sehr hohe Antigenmengen eine Toleranzinduktion gelang, wird dementsprechend zwischen einer "low zone tolerance" und "high zone tolerance" unterschieden (von FELLEBERG, 1978; ROLLE und MAYR, 1978; VORLAENDER, 1976).

Zu welchem Ergebnis die Reaktion mit dem Antigen letztlich in einem Tier führt, hängt aber immer davon ab, in welchem Maße die einzelnen dabei gebildeten Zellpopulationen wirksam werden, wobei neben den bereits angesprochenen Faktoren, wie Antigendosis, Applikationsart usw. auch Alter und physiologischer Zustand des jeweiligen Tieres eine Rolle spielen (SELL, 1977).

4.2. NEUTRALISATION DER BIOLOGISCHEN WIRKSAMKEIT

Der therapeutische und biotechnische Einsatz von gonadotropen Hormonen hat in der Veterinärmedizin zweifellos zu großen Erfolgen geführt. Daneben konnte aber vielfach gezeigt werden, daß die wiederholte Applikation von heterologen Gonadotropinen bei ein und demselben Tier einen Abfall bzw. Verlust der Hormonantwort durch die Gonaden zur Folge haben kann (REEL et al., 1976; YAMAUCHI, 1970). Beispielsweise soll eine wiederholte Gabe von HCG und PMSG in superovulatorischen Dosen zu einem progressiven Wirkungsabfall der injizierten Hormone führen (MAURER et al., 1968; PARKES, 1942; LIN und BAILEY, 1965; EDWARDS und FOWLER, 1966; LAND und McLAREN, 1967; WILLETT et al., 1953). Für die neutralisierende Wirkung scheinen Antihormone, d.h. gegen die exogenen Hormone gebildete Antikörper verantwortlich zu sein (MAURER et al., 1968; GREENWALD, 1970; LEATHEN, 1947; McDONALD, 1969; YAMAUCHI, 1970).

Der Neutralisation oder Inaktivierung von Hormonen, Enzymen oder sonstigen biologisch aktiven Molekülen liegen, wie bereits angesprochen (siehe 4.1.), verschiedene Mechanismen - in zwei Kategorien klassifiziert - zu Grunde. Ob bei einer Neutralisierung der biologischen Aktivität die direkte Inaktivierung, d.h. die Reaktion der Anti-

körper mit antigenen Determinanten des Hormonmoleküles im Vordergrund steht oder ob der Wirkungsverlust indirekt z.B. über eine schnellere in vivo-Katabolisierung bedingt ist, konnte zur Zeit noch nicht abgeklärt werden. Bei dem Pankreashormon Insulin scheinen Antikörper, die vorwiegend der Klasse IgG angehören - zu Beginn einer Insulinbehandlung auch IgM - für die neutralisierende Wirkung verantwortlich zu sein (VORLAENDER, 1976). Durch die Bindung von Insulin an Antiinsulin kann dann zwar in vivo eine Verlängerung der Halbwertszeit resultieren, da das Hormon nun mit der gleichen Geschwindigkeit wie IgG abgebaut wird. Antikörper-gebundenes Insulin kann aber dennoch seine biologische Funktion nicht ausüben (SELL, 1977).

Bei einem Vergleich der Literatur muß zwischen der neutralisierenden Wirkung von HCG-Antikörpern, die nach Hormonapplikation bei einem bestimmten Tier gebildet werden und damit die Effektivität der Therapie beeinflussen könnten und Untersuchungen zur biologischen Aktivität von HCG-Antiseren differenziert werden. Im ersten Fall wird der Organismus, im Sinne einer aktiven Immunisierung selbst zur Bildung einer spezifischen Immunität in Form von Antikörpern bzw. Immunzellen und Memoryzellen gegen das exogene Hormon veranlaßt. Die Beurteilung der neutralisierenden Wirkung von HCG-Antiseren erfolgt dagegen - ähnlich

der passiven Immunisierung - nach deren Applikation in ein anderes Tier, um dort die Kapazität des Antiserums gegen das exogene Hormon oder auch strukturverwandte endogene Gonadotropine zu bestimmen. Auf die zahlreichen experimentellen Untersuchungen der Neutralisationseffekte von HCG-Antiseren, soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Über mögliche Wirkungsrelationen bzw. deren Mechanismen zwischen einer Antihormonbildung nach HCG-Applikation und dem Auftreten einer refraktären Phase der Gonaden, liegen beim Rind noch keine wissenschaftlich auswertbaren Untersuchungen vor. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, daß HCG-Antikörper, vorrangig nach wiederholter Injektion des Präparates, durch Bindung an das exogene Hormon seinen Wirkungsverlust verursachen. Daneben könnte auch an eine Beeinträchtigung der endogenen Hormonaktivität, besonders der LH-Wirkung, die über einen negativen feed-back Mechanismus wiederum zu einer Erhöhung der LH-Ausschüttung führen könnte (GESCHWIND, 1963), nach "aktiver Immunisierung" mit HCG gedacht werden.

4.3. IMMUNPATHOGENE FOLGEN

Neben der Gefahr einer Neutralisation der Hormonwirkung auf Grund immunologischer Reaktionen, kann eine Therapie mit heterologen Gonadotropinen auch durch die Ausbildung allergischer Reaktionen kompliziert werden (LEATHEM, 1947; McDONALD, 1969). Ähnlich der Komplexität sog. Antibiotikaallergien (MAYR und BIBRACK, 1969) können nach Applikation von humanem Choriongonadotropin ebenfalls mehrere Faktoren für eine Sensibilisierung verantwortlich sein. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, daß HCG als wirksame Substanz selbst zur Auslösung immunpathogener Reaktionen führt. Daneben kommen in fast allen klinischen HCG-Präparaten Proteinverunreinigungen und Beimischungen von sog. Hilfsstoffen (siehe 5.) vor, die zur Sensibilisierung auf Grund ihrer chemischen Beschaffenheit ebenfalls Allergien zu induzieren vermögen (MAYR und BIBRACK, 1970; McDONALD, 1969).

Generell können durch Hormone sowohl humorale, als auch zelluläre Allergien hervorgerufen werden. Bei der Insulinallergie, die trotz stark verbesserter Aufbereitungsverfahren des Pankreasextraktes bis heute eine Komplikation der Diabetesbehandlung darstellt, scheinen beispielsweise Allergien vom Spättyp zu dominieren (VORLAENDER, 1976). Die Ausbildung einer bestimmten Aller-

gieform hängt neben der Applikationsart vor allem von der Spezifität des Antigenes ab (ROLLE und MAYR, 1978).

Über allergische Reaktionen auf Grund einer Therapie mit HCG liegen auf veterinärmedizinischem Gebiet keine größeren Untersuchungen vor. Nach MAYR und BIBRACK (1970) scheint der Grund hierfür unter anderem darin zu liegen, daß allgemein Arzneimittelallergien durch die ständig zunehmende Medikation, Schutzimpfungen und steigenden Verbrauch an künstlichen Futtermitteln erst in den letzten Jahren zu einem echten Problem geworden sind.

4.4. KEINE BEEINFLUSSUNG

Wie bereits angesprochen, wird der Erfolg einer HCG-Therapie beim Rind keinesfalls zwingend durch immunologische Folgereaktionen beeinträchtigt. Auf Grund der Strukturähnlichkeit von HCG und bovinem LH (MORGAN et al., 1973) wäre es zunächst denkbar, daß das applizierte Hormon nicht als antigene Substanz erkannt wird. In diesem Fall könnte eine spezifische Immunantwort generell ausgeschlossen werden, nicht aber mögliche allergische Folgereaktionen durch Verunreinigungen oder Begleitstoffe des Hormonpräparates.

Geht man davon aus, daß humanes Choriongonadotropin als heterologes Hormon vom tierischen Organismus als körperfremd bzw. antigen erkannt wird, muß es noch nicht zu einer Ausbildung spezifischer immunologischer Reaktionen kommen. In Abhängigkeit vom strukturchemischen Aufbau, Molekulargewicht, Löslichkeitsgrad und Ausscheidungsgeschwindigkeit unterscheiden sich beispielsweise die Antigene in ihrer Wirksamkeit (ROLLE und MAYR, 1978). Die Inaktivierung der Eiweiß- und Peptidhormone geht relativ schnell vor sich (DÖCKE, 1975), d.h. nach einer HCG-Injektion wird das Hormon normalerweise abgebaut und über die Niere ausgeschieden (RAO und SHAHANI, 1961). SCHAMS et al. (1978) konnten z.B. auch bei wiederholter

Applikation von PMSG, einem Hormon mit weit längerer Halbwertszeit, bei Rindern keine spezifische Antikörperbildung nachweisen. RAO und SHAHANI (1961) weisen darauf hin, daß durch Verabreichung von HCG ohne Adjuvanzzusatz auf Grund der schwachen Antigenität des Hormones wahrscheinlich nur niedere Antikörpertiter erreicht werden. Demgegenüber stehen Untersuchungen von NAKAHARA et al. (1961b, c), die auch bei therapeutischem Einsatz von HCG beim Rind, wobei die Dosierung allerdings extrem hoch lag, eine spezifische Antikörperbildung demonstrieren konnten.

Kommt es nach Applikation von HCG beim Rind wirklich zur Ausbildung spezifischer Antikörper, so bedeutet dies wiederum keinesfalls zwingend eine Komplikation der Hormontherapie durch allergische Reaktionen oder Neutralisation. Nicht alle gegen biologisch aktive Substanzen gebildeten Antikörper sind neutralisierend (SELL, 1977). Nach SELL (1977) kann eine klassische Präzipitinreaktion mit Enzymen ohne merklichen Verlust der Aktivität des präzipitierten Enzymes erfolgen. Wie die Bildung der Antikörper werden auch ihre Auswirkungen durch eine Vielzahl von charakteristischen Faktoren beeinflusst, wie z.B. dem Verhältnis von Antikörper zu Antigen, der Affinität, Avidität u.s.w. Auch für das Ausmaß und den Typ von allergischen Erkrankungen spielen bestimmte Faktoren,

wie Applikationsart, Dosierung des Antigenes - speziell bei der Entstehung anaphylaktoider Reaktionen - und Zeitpunkt der erneuten Antigenzufuhr eine wichtige Rolle. Eine besondere Bedeutung kommt auch der Art, Menge und Lokalisierung der Immunkörper zu, die nach dem Erstkontakt mit dem Antigen, d.h. nach der Sensibilisierung gebildet worden sind (MAYR und BIBRACK, 1969). So kann beispielsweise ein anaphylaktischer Schock erst dann ausgelöst werden, wenn ausreichend hohe Mengen zirkulierender Antikörper vorhanden sind, oder eine intradermale Applikation eines Antigenes führt nur dann zur Ausbildung allergischer Reaktionen, wenn genügend Antikörper im Gewebe angereichert sind (MAYR und BIBRACK, 1969).

5. BEDEUTUNG VON BEGLEIT- UND HILFSSTOFFEN IN HCG- PRÄPARATEN ALS ANTIGENE BZW. HAPTENE

Die Genese von Allergien gegen Hormonpräparate ist sehr komplex. Das Hormon kann, wie bereits besprochen, als wirksame Substanz selbst zur Auslösung von Allergien führen, wobei, je nach dem chemischen Aufbau, der Quantität und der Applikationsart, Allergien vom Sofort- und Spättyp sowie sog. anaphylaktoide Reaktionen entstehen können. Neben der spezifisch wirksamen Substanz kommen aber in fast allen biologischen Präparaten noch Proteinverunreinigungen und Beimischungen von sog. Hilfsstoffen, wie Suspensionsvermittler, Antioxydantien, Entschäumer u.s.w. vor, die aus der modernen pharmazeutischen Industrie nicht mehr wegzudenken sind. Auch sie vermögen Allergien zu induzieren und können damit für die Sensibilisierung verantwortlich sein. Im Rahmen der Untersuchung von Antibiotikaallergien gelang beispielsweise der Nachweis, daß ein großer Teil allergischer Erkrankungen nach Applikation bestimmter Penicillinpräparate zu Lasten einer stark antigenen Proteinverunreinigung geht (BATCHELOR et al., 1967).

Da sog. Hilfsstoffe nicht nur in Hormonpräparaten sowie in vielen anderen biologischen Präparaten, wie z.B. Antibiotika, Vitaminpräparaten, Impfstoffen u.a., sondern

auch in der Futtermittelindustrie Verwendung finden, dürfen sie als mögliche Ursache bei der Entstehung von Allergien nicht unterschätzt werden (ROLLE und MAYR, 1978). Durch die Verbreitung dieser Substanzen über Futtermittel, prophylaktische Antibiotika- und Vitamingaben, sowie Schutzimpfungen, die durch die modernen Haltungsbedingungen in den Nutztierbeständen begünstigt wird und den massiven Einsatz von Hormonpräparaten, kam es in letzter Zeit zu einem vermehrten Auftreten allergischer Reaktionen (MAYR und BIBRACK, 1969). Schwierig bzw. meist unmöglich ist jedoch die Abklärung der Genese solcher pathogenen Immunreaktionen, da dieses komplexe Geschehen ein exaktes Studium aller im auslösenden Präparat enthaltenen Komponenten erfordert. Es ist daher verständlich, daß viele Erkrankungen den jeweils spezifisch wirksamen Substanzen zugeschrieben werden, obwohl sie durch sog. Hilfsstoffe verursacht werden.

MAYR und BIBRACK (1969) konnten mit Hilfe der aktiven Systemanaphylaxie, dem passiven cutanen Anaphylaxie-Test (PCA) und der Präzipitation im flüssigen Medium nachweisen, daß die Suspensionsvermittler Cremophor, Methylcellulose, Natrium-Carboxymethylcellulose und Carbowax (evtl. auch die Entschäumer "Bayer E" und "Silicon MS") antigene Determinanten besitzen, die im prädisponierten Rind zur Sensibilisierung führen.

Da die obengenannten Substanzen durch das Fehlen von Proteinanteilen als Haptene charakterisiert waren, wurden dementsprechend bei sensibilisierten Tieren nur humorale Allergien festgestellt. Der Antikörpernachweis gelang hier durch passive Übertragung auf Versuchstiere (Ziege, Kalb) und in der Präzipitation. Zudem stimmten bei diesen Untersuchungen die durch in vivo- und in vitro-Versuche gewonnenen Befunde mit der Symptomatik der im sensibilisierten Tier ausgelösten allergischen Erkrankung überein. In Abhängigkeit vom Grad der Sensibilisierung wurden die für eine sofortreagierende Allergie typischen klinischen Symptome, wie Unruhe, Juckreiz, Speichel- und Tränenfluß, Urticaria, sowie anaphylaktischer Schock, kurz nach der Antigeninjektion beobachtet (MAYR und BIBRACK, 1969). Nach Meinung der Autoren sind Allergien vom Spättyp (zelluläre Allergien), induziert durch Begleit- oder Hilfsstoffe, auf Grund der chemischen Struktur dieser Substanzen kaum zu erwarten. Weiter nehmen sie an, daß Untersuchungen über die anaphylaktoide Wirkung von Hilfsstoffen, auf Grund des toxischen Wirkungsmechanismus einer anaphylaktoiden Reaktion bereits bei entsprechenden routinemäßigen Toxizitätsprüfungen erfaßt werden. An Hand dieser Ergebnisse wird verständlich, wie komplex die Genese von Allergien gegen biologische Präparate sein kann und wie viele Faktoren neben dem spezifischen Wirkstoff noch berücksichtigt werden müssen. Da das Problem allergischer Erkrank-

kungen beim Tier in nächster Zeit sicherlich immer stärker in den Vordergrund rücken wird, ist es, um steigenden Verlusten frühzeitig zu begegnen, unbedingt erforderlich, daß Forschung und Industrie eng bei der Ausarbeitung brauchbarer Methoden sowie sinnvollen Anwendung von biologischen Präparaten zusammenarbeiten (MAYR und BIBRACK, 1969).

6. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

6.1. MATERIAL UND METHODEN

6.1.1. VERWENDETE HORMONE UND CHEMIKALIEN

- a) Primogonyl^k (Schering AG, Berlin/Bergkamen)
5000 IE HCG/Ampulle (lyophilisiert)
Sofern im experimentellen Teil keine besonderen Angaben gemacht werden, wurde als HCG-Präparat stets Primogonyl^R verwendet.
- b) Gonagestrol^R (Vemie, Kempen)
3000 IE HCG + 125 mg Progesteron/Ampulle
- c) Freund'sches Adjuvans komplett (FAC)
Freund'sches Adjuvans inkomplett (FAI)
(Behring Werke AG, Marburg-Lahn)
- d) Dulbecco's phosphate buffered salt solution (PBS)
(Serva, Heidelberg)
- e) Tannin, gepulvert (Merck, Darmstadt)
- f) Heparin-Novo, 5000 IE/ml
(Novo Industrie GmbH Pharmazeutika, Mainz)

6.1.2. KANINCHENVERSUCH

6.1.2.1. IMMUNISIERUNGSSCHEMA

Zur Verfügung standen 11 Bastardkaninchen im Alter von 6-12 Monaten. Die Tiere wurden in 5 Gruppen à 2 Tiere eingeteilt, ein Tier diente als unbehandelte Kontrolle. Pro Injektion wurden folgende HCG-Dosen verabreicht:

Gruppe 1: 5000 IE/Tier

Gruppe 2: 2500 IE/Tier

Gruppe 3: 1000 IE/Tier

Gruppe 4: 500 IE/Tier

Gruppe 5: Adjuvans-Kontrolle

Die pro Tier verabreichte HCG-Dosis wurde in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst und mit 1 ml Freund's Adjuvans (komplett) emulgiert. Diese Emulsion wurde den Tieren auf zwei Stellen verteilt am Rücken subcutan injiziert. Tiere der Gruppe 5 erhielten nur 1 ml Freund's Adjuvans mit 1 ml physiologischer NaCl-Lösung. Diese Behandlung wurde insgesamt 3 mal im Abstand von 2 Wochen durchgeführt.

6.1.2.2. BLUTENTNAHMEN

Vor der Immunisierung wurden von allen Tieren 6 Blutproben im Abstand von 2-3 Tagen genommen, nach Beginn der HCG-Applikation wöchentlich je 1 Probe bis zur 8. Woche. Bei jeder Blutentnahme wurden etwa 3 ml Blut aus der Ohrvene gewonnen.

Je ein Tier aus Gruppe 2, 3 und 4 sowie die Tiere der Gruppe 5 und das Kontrolltier wurden 63 Tage nach der letzten Injektion durch Genickschlag betäubt und durch Herzpunktion entblutet.

Die Tiere der Gruppe 1 sowie je 1 Tier der Gruppe 2, 3 und 4 erhielten 56 Tage nach der dritten HCG-Applikation je 2000 IE HCG, gelöst in 2 ml physiologischer NaCl-Lösung, intravenös.

Danach wurden weitere 11 Blutproben bis zum 24. Tag nach dieser Booster-Injektion genommen. Am 27. Tag wurden ein Tier aus Gruppe 1 und die Tiere aus Gruppe 2 und 3 nach Betäubung entblutet.

Die beiden letzten Tiere (aus Gruppe 1 und 4) erhielten am 28. Tag nach der ersten intravenösen Applikation des HCG eine weitere Boosterung (2500 IE HCG in 2 ml physiologischer NaCl-Lösung intravenös).

Im Abstand von 2 Tagen wurden noch 3 Blutproben gewonnen. Anschließend wurden die Tiere ebenfalls entblutet.

6.1.2.3. SERUMGEWINNUNG

Die Blutproben wurden bei Zimmertemperatur ca. 1-2 Stunden stengelassen und anschließend 15 Minuten bei 5000 U/Min. zentrifugiert. Das Serum wurde in Plastikröhrchen abgefüllt und bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert.

6.1.3. RINDERVERSUCHE

6.1.3.1. FELDUNTERSUCHUNG

Mit dieser Untersuchung sollte überprüft werden, wieweit nach einmaligem, therapeutischen Einsatz eines HCG-Präparates mit einer Antikörperbildung zu rechnen ist. Im Einzugsgebiet der Ambulatorischen Tierklinik der Universität München wurden von 76 Kühen und Kalbinnen (Rasse Deutsches Fleckvieh) aus verschiedenen Betrieben Blutproben entnommen. Die Tiere wurden je nach Vorbehandlung in 3 Gruppen eingeteilt:

Gruppe I : 28 Kalbinnen, die nach Angaben der Besitzer noch nie mit HCG oder anderen Hormonen behandelt worden waren (1 Blutprobe/Tier).

Gruppe II : 24 Kühe, denen vor einiger Zeit zur Behandlung von Ovarialzysten das Präparat Gonagestrol^R (3000 IE HCG + 125 mg Progesteron) intravenös verabreicht worden war (1 Blutprobe/Tier).

Gruppe III: 24 Kühe, die wegen Ovarialzysten zur Behandlung vorgestellt wurden. Zur Therapie wurde ebenfalls Gonagestrol^R eingesetzt. Bei diesen Tieren wurden je 3 Blutproben gesammelt:

Probe 0: Entnahme unmittelbar vor der HCG-
Injektion

Probe 1: Entnahme 3-26 Tage nach der HCG-
Applikation ($\emptyset$ 8 Tage)

Probe 2: Entnahme 14-73 Tage nach der HCG-
Applikation ($\emptyset$ 27 Tage)

6.1.3.2. IMMUNISIERUNGSVERSUCH

6.1.3.2.1. VERSUCHSTIERE

Verwendet wurden 4 Kühe und 4 Bullen der Rasse Deutsches Fleckvieh. 3 Kühe (A_1 , A_2 , A_3) und 3 Bullen (B_1 , B_2 , B_3) erhielten je vier HCG-Injektionen im Abstand von 21 Tagen. 1 Kuh (C_1) und 1 Bulle (C_2) dienten als Kontrollen.

Bei der ersten Applikation wurden den Kühen je 5000 IE, den Bullen je 10 000 IE HCG, auf vier Stellen verteilt, intramuskulär verabreicht. Die gesamte HCG-Dosis pro Tier wurde jeweils in 5 ml phys. NaCl-Lösung gelöst. Bei der zweiten und dritten Applikation wurden allen Tieren 5000 IE intravenös verabreicht, die vierte (5000 IE) erfolgte bei den Tieren A_2 , A_3 , B_2 und B_3 intravenös; A_1 und B_1 erhielten dieselbe Dosis, in 5 ml Freund's Adjuvans (inkomplett) emulgiert, intramuskulär auf vier Stellen verteilt.

Blutprobenentnahme:

Vor der ersten HCG-Applikation wurden 6 Blutproben im Abstand von 4 Tagen gewonnen, nach dem Beginn der Immunisierung in 2-tägigen Abständen bis zum 120. Tag. Bei den Kontrolltieren wurden je 10 Blutproben in 4-tägigen Abständen entnommen. Die Blutproben wurden wie unter 6.1.2.3. beschrieben, verarbeitet und gelagert.

6.1.4. NACHWEISMETHODEN FÜR ANTIKÖRPER

6.1.4.1. IN VITRO TEST

6.1.4.1.1. PASSIVE HÄMAGGLUTINATION

Für den Nachweis der HCG-Antikörper im Blutserum wurde der passive Hämagglutinationstest (PHA-Test) mit Schaferythrozyten verwendet.

6.1.4.1.1.1. HERSTELLUNG DER ERYTHROZYTENSUSPENSION

Schafblut, jeweils ca. 50 ml, wurde in sterilen Glasröhrchen mit Heparinlösung aufgefangen (Heparin-Novo, 2,0 ml einer 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnten Lösung; Heparinendkonzentration 20 IE/ml Blut).

Zur Gewinnung der Erythrozyten wurde das Blut bei 750 g 15 Minuten zentrifugiert, das Plasma verworfen, das Erythrozytensediment wieder auf etwa 50 ml mit physiologischer NaCl-Lösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Erythrozyten wurden so dreimal gewaschen. Nach dem letzten Abzentrifugieren wurden zweimal 0,6 ml des Erythrozytensedimentes abpipettiert und in je 10 ml PBS-Lösung suspendiert. Zu diesen Suspensionen wurden je

10 ml Tanninlösung (5 mg Tannin gelöst in 50 ml PBS) gegeben. Anschließend wurden die Mischungen 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten abzentrifugiert (5 Minuten bei 750 g), der Überstand verworfen, die Zellen in 20 ml PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und das Erythrozytensediment dann in 10 ml PBS resuspendiert.

6.1.4.1.1.2. KOPPELUNG VON HCG AN DIE ERYTHROZYTEN

Die eine der beiden nach 6.1.4.1.1.1. hergestellten Erythrozytensuspensionen wurde mit 10 ml PBS, in der 15 000 IE HCG gelöst waren, versetzt. Zur anderen wurden 10 ml reine PBS zugegeben (Kontrolle). Beide Suspensionen wurden 1 Stunde lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Darauf wurden die Erythrozyten noch dreimal in jeweils 20 ml PBS, der 1 % normales Kaninchenserum zugesetzt war, gewaschen. (Das Kaninchenserum war zuvor 1 Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert und zweimal mit Schafererythrozyten auf folgende Weise absorbiert worden: 10 ml Kaninchenserum wurden mit 2,5 ml Schafererythrozyten-Sediment gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten bei 750 g für 15 Minuten abzentrifugiert, das überstehende Kaninchenserum abgehebert, nochmals mit 2,5 ml Schafererythrozyten-Sediment gemischt und inkubiert.) Die Erythrozyten wurden dann in 24 ml dieser PBS-Lösung resuspendiert, um eine etwa 2,5 %ige Zellsuspension des Ausgangsmaterials zu erhalten.

6.1.4.1.1.3. DURCHFÜHRUNG DES TESTES

In Mikrotiter-V-Platten wurden von den zu prüfenden Seren Verdünnungsreihen in 2er Potenzen mit 0,025 ml Serum, beginnend mit der Verdünnung 1:2, angesetzt. Zu jeder Verdünnungsstufe wurde 0,025 ml der mit HCG beladenen Erythrozytensuspension gegeben.

Als Kontrollen dienten das Kaninchenserum mit dem höchsten Antikörpertiter gegen HCG (positive Kontrolle) und PBS + 1 % normales Kaninchenserum (negative Kontrolle). Weiterhin wurden alle Seren und PBS + Kaninchenserum mit nicht sensibilisierten Erythrozyten auf unspezifische Reaktionen überprüft (Serumkontrolle bzw. PBS-Kontrolle).

Die Gemische wurden bei Zimmertemperatur ca. 18 Stunden stehengelassen. Dann wurde die Reaktion abgelesen.

6.1.4.2. IN VIVO TESTS

6.1.4.2.1. INTRAKUTANTEST IN DER SCHWANZFALTE

Zur Überprüfung allergischer Reaktionen wurde bei 5 mit HCG vorbehandelten Rindern und bei 5 Kontrolltieren (K_1 - K_5) eine HCG-Lösung intradermal in die Schwanzfalte injiziert. Bei den vorbehandelten Tieren handelte es sich um die Kühe A_1 und A_3 , sowie die Bullen B_1 , B_2 und B_3 des Immunisierungsversuches (6.1.3.2.). Zum Zeitpunkt der Durchführung des Schwanzfaltentestes hatten die Tiere A_1 und B_1 bereits 4 HCG-Injektionen erhalten, die letzte Injektion lag 15 Tage zurück. Die Bullen B_2 und B_3 hatten lediglich 2 HCG-Injektionen erhalten, die zweite vor 5 Tagen. Die Kuh A_3 hatte 4 Tage vor dem Test die erste HCG-Injektion erhalten.

Als Kontrolltiere dienten 5 unbehandelte Rinder desselben Bestandes.

Allen Tieren wurde mit einer Tuberkulinspritze in die linke Schwanzfalte 0,1 ml physiologische NaCl-Lösung, in die rechte Schwanzfalte 0,1 ml physiologische NaCl-Lösung + 2500 IE HCG intradermal injiziert. Die Dicke der Schwanzfalten wurde mit einem Kutimeter vor der Injektion sowie 1, 2, 6 und 24 Stunden nach der Injektion gemessen.

6.1.4.2.2. INTRAKUTANTEST AN DER SCHULTERHAUT

Nach Abschluß der Immunisierung (6.1.3.2.) wurde bei 6 Rindern ein weiterer Hauttest vorgenommen. Die Tiere A₁ und B₁ hatten 13 Wochen zuvor, A₂, B₂ und B₃ 7 Wochen zuvor und A₃ 4 Wochen zuvor die letzte HCG-Applikation erhalten. Als Kontrolltiere dienten 4 Rinder desselben Bestandes (K₆-K₉).

Im Bereich der Schulter wurde eine Hautfläche von ca. 30 x 30 cm rasiert und mit Alkohol gereinigt. An 6 je 10 cm voneinander entfernten Hautstellen wurden folgende Lösungen intradermal injiziert:

- Stelle 1: 0,1 ml physiologische NaCl-Lösung
- Stelle 2: 0,1 ml Freund'sches Adjuvans (inkomplett)
- Stelle 3: 2500 IE HCG in 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung
- Stelle 4: 1250 IE HCG in 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung
- Stelle 5: 625 IE HCG in 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung
- Stelle 6: 312 IE HCG in 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung

Bei den 4 Kontrolltieren wurde der Hauttest in gleicher Weise durchgeführt, jedoch erhielten lediglich 2 Tiere Freund's Adjuvans, bei den anderen blieb die Stelle 2

frei. Die Häutdicke an den Injektionsstellen wurde vor der Applikation, 10 Minuten danach sowie stündlich bis zur 5. Stunde und nochmals nach 24 Stunden mit einem Kutimeter gemessen.

6.2. ERGEBNISSE

6.2.1. KANINCHENVERSUCH

Die vor der ersten HCG-Applikation entnommenen Blutproben der Tiere aus Gruppe 1-4 sowie alle Proben der Tiere aus Gruppe 5 und die des Kontrolltieres wiesen einen Titer von höchstens 1:2 auf.

Nach der ersten HCG-Injektion erreichten in Gruppe 1 die Titer Werte von 1:4 bzw. 1:8, in den Gruppen 2, 3 und 4 war ein Titeranstieg jeweils nur bei einem Tier festzustellen (Abb. 1-4). Die 2. und 3. Injektion führte dagegen in allen 4 Gruppen zu einem deutlichen Titeranstieg; der höchste Titer lag bei 1:1024 (Gruppe 1). Etwa 10-20 Tage nach der 3. Injektion sanken die Titer ab. Durch die intravenöse Nachboosterung konnten die Titer auf dieselbe Höhe wie nach der 3. Injektion angehoben werden. Die 2. Nachboosterung ließ die Titer noch weiter ansteigen. Der höchste Titer lag nunmehr bei 1:4096. In den Gruppen 1, 2 und 3 verliefen die Titer analog und auf vergleichbarer Höhe. In Dosisgruppe 4 reagierte ein Tier nur mit sehr geringer Antikörperbildung, der Titer erreichte nach dreimaliger Injektion nur 1:16.

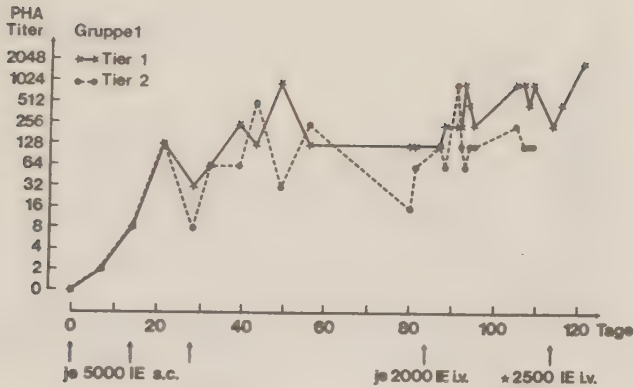


Abb. 1: Antikörpertiter nach HCG-Injektion bei Kaninchen
(PHA = passive Hämagglutination)

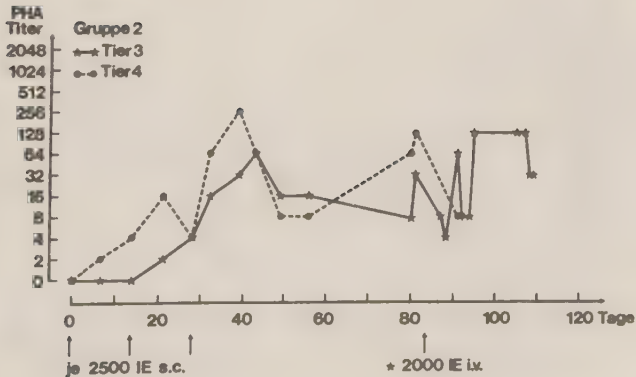


Abb. 2: Antikörpertiter nach HCG-Injektion bei Kaninchen
(PHA = passive Hämagglutination)

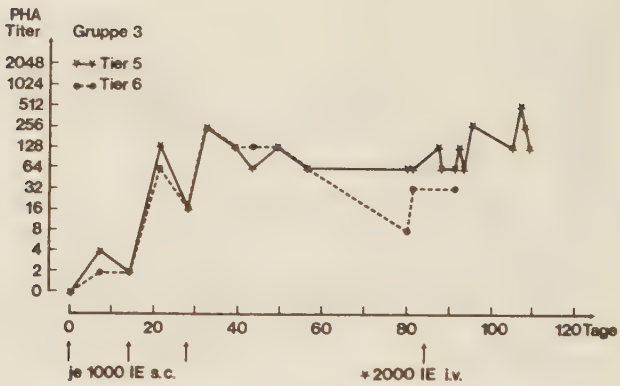


Abb. 3: Antikörpertiter nach HCG-Injektion bei Kaninchen
(PHA = passive Hämagglutination)

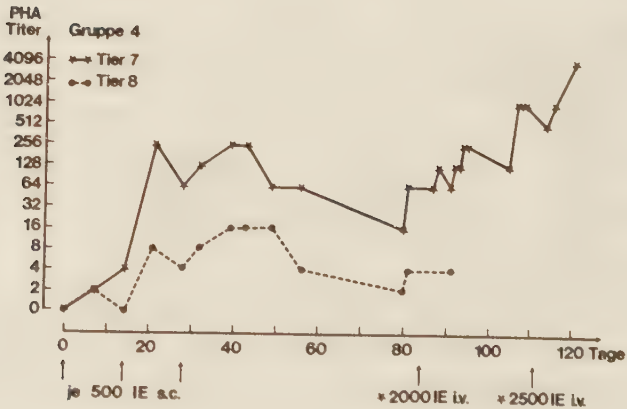


Abb. 4: Antikörpertiter nach HCG-Injektion bei Kaninchen
(PHA = passive Hämagglutination)

6.2.2. RINDERVERSUCHE

6.2.2.1. FELDUNTERSUCHUNG

Die Blutproben von 8 Tieren aus der Kontrollgruppe (Gruppe 1) wiesen Titer von 1:8 auf, bei weiteren 8 Tieren wurden Titer von 1:4, bei 11 Tieren Titer von 1:2 festgestellt, bei einem Tier war kein Titer nachweisbar (Tab.1).

Auf Grund dieser Befunde wurde der Titer von 1:8 beim Rind als Grenztiter für unspezifische Reaktionen im verwendeten Testsystem angesehen.

In der Gruppe der vorbehandelten Kühe (Gruppe 2) wies lediglich die Blutprobe eines Tieres einen über dem Grenzwert liegenden Titer (1:16) auf. In Gruppe 3, das sind die Tiere, von denen Blutproben vor und nach der Behandlung untersucht wurden, hatten nur 3 der insgesamt 72 Blutproben Titer über 1:8. Unter den Proben vor der Injektion und den ersten Proben nach der Behandlung wurde je einmal ein Titer von 1:16 gefunden, unter den zweiten Verfolgsproben einmal ein Titer von 1:32. Diese drei als positiv angesehenen Titer wurden bei drei verschiedenen Tieren ermittelt.

Tab. 1: Hämagglutinationstiter gegen HCG von Serumproben aus der Felduntersuchung

Hämagglut. Titer	unbehandelte Kalbinnen n = 28	mit HCG vorbehandelte Kühe *	Kühe in HCG-Behandlung *	
		n = 24	vor Appli- kation	1.Verfolgs- probe 2.Verfolgs- probe
bis 1: 2	12	7	7	4
1: 4	8	9	11	10 11
1: 8	8	7	5	9 7
über 1:16	0	1	1	1 1

* HCG-Behandlung: Gonagestrol^R (3000 IE HCG + 125 mg Progesteron) intravenös

6.2.2.2. IMMUNISIERUNGSVERSUCH

Die vor der ersten HCG-Injektion gewonnenen Blutproben wiesen Titer von maximal 1:8 auf. Nach der ersten Injektion veränderten sich die Titer bei den Kühen nicht, bei den Bullen stiegen sie auf 1:16 an. Die zweite Injektion führte bei der Kuh A₃ zu einem kurzfristigen Anstieg des Titers auf 1:32; die Titer der anderen Kühe blieben im Bereich bis 1:8. Bei den Bullen pendelten die Titer um 1:8 (B₁ und B₃) bzw. um 1:16 (B₂). Die dritte und vierte Injektion verursachten keine weiteren Antikörperbewegungen mit Ausnahme von Kuh A₁. Bei diesem Tier erreichte der Titer nach der vierten Injektion, die unter Zusatz von Adjuvans erfolgt war, über 4 Wochen hin Werte von 1:32.

Bei den Kontrolltieren C₁ und C₂ bewegten sich die Titer zwischen 1:4 und 1:8.

6.2.2.3. INTRAKUTANTEST IN DER SCHWANZFALTE

Die Injektion von 2500 IE HCG verursachte bei Kontrolltieren und immunisierten Tieren eine Dickenzunahme der Schwanzfalte (Tab. 2 und 3). Die maximale Dickenzunahme betrug bei den einzelnen immunisierten Tieren zwischen 1,5 und 23,7 mm; auffallend stark reagierten lediglich die beiden Tiere A₁ und B₁, die bereits 4 HCG-Injektionen, davon die letzte unter Zusatz von FAI, erhalten hatten. Bei den übrigen immunisierten Tieren lag die Dickenzunahme etwa im selben Größenbereich wie bei den Kontrolltieren (1,5 - 4,0 mm).

Die Hautanschwellung entwickelte sich rasch, das Maximum war bei allen Tieren 1-2 Stunden nach der Injektion erreicht (Abb. 5). Entsprechend rasch verlief die Rückbildung. Sie setzte häufig bereits 6 Stunden nach der Injektion ein. Nach 24 Stunden war die Anschwellung bei allen Kontrolltieren und bei den immunisierten Tieren A₃ und B₃ auf weniger als 10 % zurückgegangen. Bei der Kuh A₁, welche die stärkste Anschwellung gezeigt hatte, ging die Rückbildung verzögert vonstatten. Nach 24 Stunden betrug die Zunahme noch immer 100 %, nach 48 Stunden noch 49 %. Allgemeinreaktionen waren bei keinem Tier zu beobachten.

Tab. 2: Dickenzunahme der Schwanzfalte bei den immunisierten Tieren nach intradermaler Injektion von HCG bzw. physiologischer NaCl-Lösung (Angaben in mm)

Zeit	2500 IE HCG in 0,1 ml phys. NaCl					0,1 ml phys. NaCl				
	A ₁	B ₁	B ₂	B ₃	A ₃	A ₁	B ₁	B ₂	B ₃	A ₃
vor Injektion	7,3	8,1	8,0	6,0	9,0	7,3	7,5	8,7	8,7	8,0
1 ^h p. inj.	15,3	20,0	9,5	9,0	12,5	7,3	7,5	8,7	8,8	8,2
2 ^h p. inj.	31,0	31,0	9,5	11,0	12,3	7,5	7,6	8,6	8,8	8,1
6 ^h p. inj.	31,0	31,0	8,7	9,0	11,2	kein Wert	7,5	8,5	8,6	8,0
24 ^h p. inj.	13,0	10,0	8,0	9,2	9,6	7,4	7,5	8,7	8,7	8,0
maximale Zunahme in mm	23,7	22,9	1,5	5,0	3,5	0,2	0,1	0	0,1	0,2
Zunahme in %	325	283	19	83	39	3	1	0	1	3

+ keine Messung, da eine diffuse Schwellung von der mit HCG behandelten Seite übergriff

Tab. 3: Dickenzunahme der Schwanzfalte bei den Kontrolltieren nach intradermaler
Injektion von HCG bzw. physiologischer NaCl-Lösung (Angaben in mm)

Zeit	2500 IE HCG in 0,1 ml phys. NaCl					0,1 ml phys. NaCl				
	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅	K ₁	K ₂	K ₃	K ₄	K ₅
vor Injektion	7,7	6,5	3,5	6,0	7,0	7,2	4,5	3,7	6,0	6,5
1 ^h p. inj.	9,0	8,0	7,0	9,0	8,5	7,4	4,6	3,7	6,0	6,8
2 ^h p. inj.	10,0	8,5	7,5	9,0	8,5	7,3	4,6	3,8	6,2	6,9
6 ^h p. inj.	9,0	7,0	7,5	9,0	8,5	7,2	4,5	3,7	6,0	6,5
24 ^h p. inj.	8,0	7,0	3,5	8,0	8,1	7,2	4,5	3,5	6,0	6,8
maximale Zunahme in mm	2,3	2,0	4,0	3,0	1,5	0,2	0,1	0,1	0,2	0,4
Zunahme in %	30	31	114	50	21	3	2	3	3	6



Abb. 5: Dickenzunahme der rechten Schwanzfalte 2 Stunden nach intradermaler Injektion von 2500 IE HCG bei einem immunisierten Tier (B_1)

6.2.2.4. INTRAKUTANTEST AN DER SCHULTERHAUT

Die immunisierten Tiere entwickelten an den Hautstellen, in die 2500 IE, 1250 IE bzw. 625 IE HCG injiziert worden waren, eine signifikante Hautanschwellung im Vergleich zu den mit physiologischer NaCl-Lösung behandelten Stellen (Tab. 4; Abb. 6). Bei der mit der niedrigsten HCG-Dosis (312 IE) behandelten Stelle war die Dickenzunahme statistisch nicht gesichert.

Die Stärke der Anschwellung zeigte bei den immunisierten Tieren keine gesicherte Abhängigkeit von der Höhe der lokal applizierten HCG-Dosis.

Bei den Kontrolltieren trat nach Injektion von HCG an allen Hautstellen eine signifikante Dickenzunahme ein ($P \leq 0.01$; Tab. 5). Sie war jedoch niedriger als bei den immunisierten Tieren ($P \leq 0.01$; Tab. 6). Die höchste HCG-Dosis (2500 IE) ergab bei den Kontrolltieren eine stärkere Anschwellung ($P \leq 0.05$) als die niedrigste HCG-Dosis (312 IE). Bei den mittleren Dosierungen waren die Unterschiede geringer (Differenz zur niedrigsten HCG-Dosis $P \leq 0.05$).

Das Maximum der Anschwellung war bei allen Tieren etwa 1-2 Stunden nach der Injektion erreicht. Die Applikation

von Freund's Adjuvans (inkomplett) verursachte dagegen eine länger anhaltende Schwellung, deren Maximum erst nach 24 Stunden auftrat (Abb. 7). Nach 36 Stunden setzte an diesen Hautstellen eine Nekrose ein.

Bei den Kühen A₁ (immunisiert) und K₇ (unbehandelt) traten etwa 30 Minuten nach der intradermalen Injektion Allgemeinreaktionen auf (Abb. 8 und 9). Die Tiere wurden unruhig und äußerten heftigen Juckreiz an Augenlidern, Nase, Anus und Vulva. Es entwickelte sich ein starkes Ödem der Konjunktival- und Vestibularschleimhaut, Tränen- und Speichelsekretion setzten ein. Da bei der Kuh A₁ nach ca. einer Stunde eine starke zyanotische Verfärbung der sichtbaren Schleimhäute eintrat, wurde das Tier symptomatisch mit Kortikosteroiden und Antihistaminika behandelt. Bei der Kuh K₇ klangen die beschriebenen Symptome nach 2 Stunden ohne Behandlung wieder ab.

Tab. 4: Zunahme der Hautdicke an der Schulter bei immunisierten Tieren 2 Stunden nach intradermaler Injektion verschiedener HCG-Dosen bzw. Kontrolllösungen (Angaben in mm)

Tier Nr.	physiologische NaCl-Lösung	Freund's Adjuvans inkomplett +	2500 IE HCG	1250 IE HCG	625 IE HCG	312 IE HCG
A ₁	0,2	6	5	2,5	4	4,5
A ₂	0,3	3,5	3,4	2	1,5	1,1
A ₃	0,4	5,1	6,5	6,4	6,5	5,6
B ₁	0,3	6,5	7,4	7,1	11,5	10,5
B ₂	0,3	10,5	8,5	8,2	5,7	2,7
B ₃	0,5	5,8	10,5	7	5,7	1,7
$\bar{x}$	0,3	6,2 **	6,8 **	5,5 *	5,8 *	4,3

** Differenz zwischen 2500 IE HCG bzw. FAI und NaCl-Lösung $P \leq 0.01$ (Tukey-Test)

* Differenz zwischen 1250 IE HCG bzw. 625 IE HCG und NaCl-Lösung $P \leq 0.05$ (Tukey-Test)

+ ...

Tab. 5: Zunahme der Hautdicke an der Schulter bei Kontrolltieren 2 Stunden nach intra-
dermalen Injektion verschiedener HCG-Dosen bzw. Kontrolllösungen (Angaben in mm)

Tier Nr.	physiologische NaCl-Lösung	Freund's Adjuvans inkomplett +	2500 IE HCG	1250 IE HCG	625 IE HCG	312 IE HCG
K ₆	0,4	4	2,2	2,5	2,1	1,5
K ₇	0,3	3,4	4,3	3,5	2,5	2,7
K ₈	0,4	-	3,2	2,9	2,5	2,6
K ₉	0,5	-	3,5	3,1	2,0	1,5
$\bar{x}$	0,4	-	3,3 **	3,0 **	2,3 **	2,1 **

** Differenz zwischen 2500 IE HCG, 1250 IE HCG, 625 IE HCG, 312 IE HCG und NaCl-Lösung $P \leq 0.01$ (Tukey-Test)

* Differenz zwischen 2500 IE HCG und 312 IE HCG $P \leq 0.05$ (Tukey-Test)

+ Messung nach 24 Stunden, dem Zeitpunkt der maximalen Reaktion nach FAI

- die Tiere K₈ und K₉ erhielten kein FAI

Tab. 6: Durchschnittliche Hautdickenzunahme an der Schulter
2 Stunden nach intradermaler Injektion verschiedener
HCG-Lösungen (Angaben in mm)

HCG-Dosis	immunisierte Tiere n = 6	Kontrolltiere n = 4
2500 IE	6,8	3,3*
1250 IE	5,5	3,0
625 IE	5,8	2,3
312 IE	4,3	2,1
$\bar{x}$	5,6**	2,6

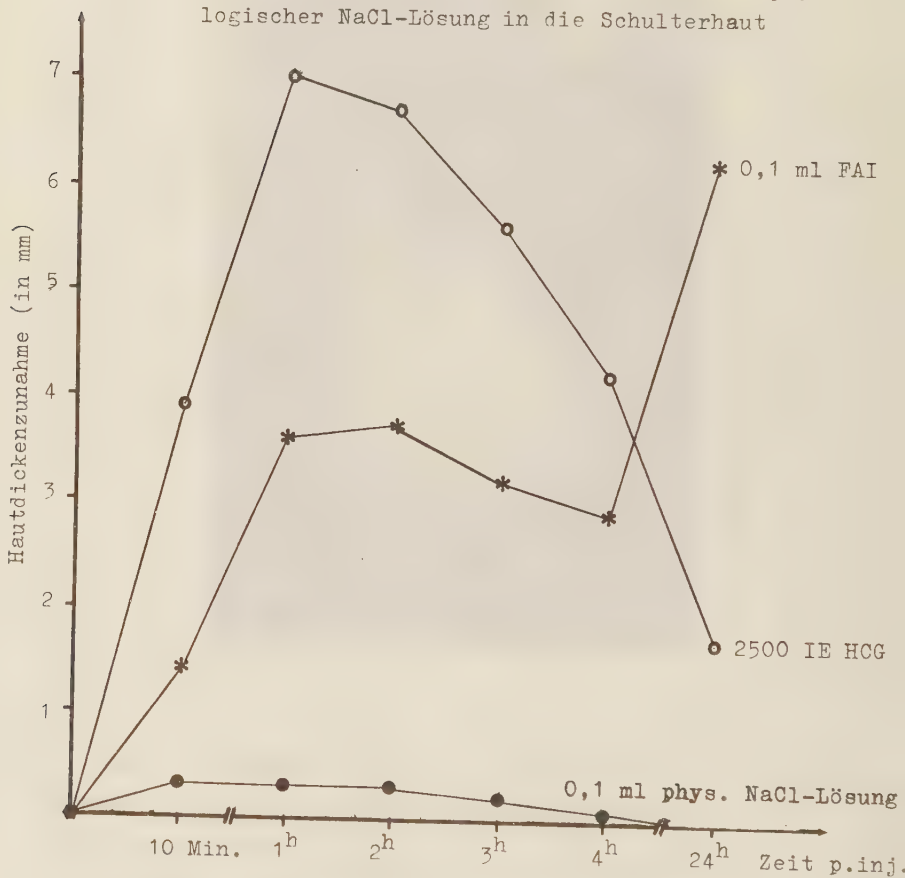
** Differenz zwischen immunisierten Tieren und Kontrolltieren $P \leq 0.01$ (t-Test)

* Differenz zwischen 2500 IE HCG und 312 IE HCG bei Kontrolltieren
 $P \leq 0.05$ (Tukey-Test)



Abb. 6: Hautanschwellung bei einem immunisierten Tier (B_1) 2 Stunden nach Injektion der verschiedenen HCG- bzw. Kontrollösungen (1 = NaCl-Lösung, 2 = FAI, 3 = 2500 IE HCG, 4 = 1250 IE HCG, 5 = 625 IE HCG, 6 = 312 IE HCG)

Abb. 7: Verlauf der Hautdickenzunahme bei immunisierten Tieren nach Injektion von 2500 IE HCG, 0,1 ml Freund's Adjuvans inkomplett bzw. 0,1 ml physiologischer NaCl-Lösung in die Schulterhaut



- physiologische NaCl-Lösung
- * Freund's Adjuvans inkomplett (FAI)
- 2500 IE HCG

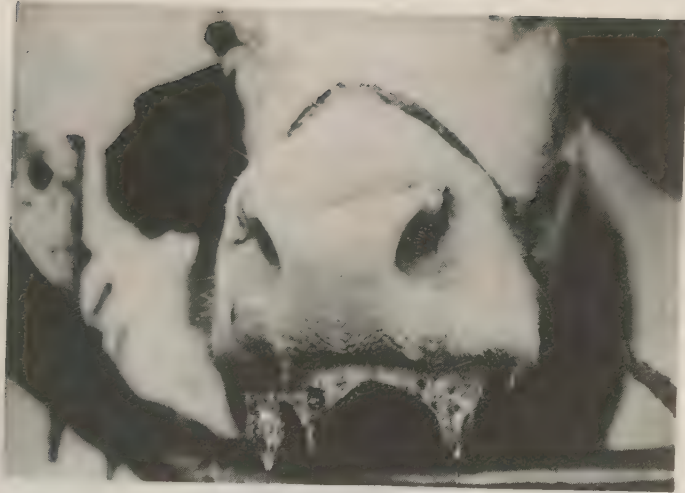


Abb. 8: Allgemeinreaktion bei einem Kontrolltier (K₇)
30 Minuten nach dem Intrakutantest an der
Schulterhaut (Zyanose, Salivation)

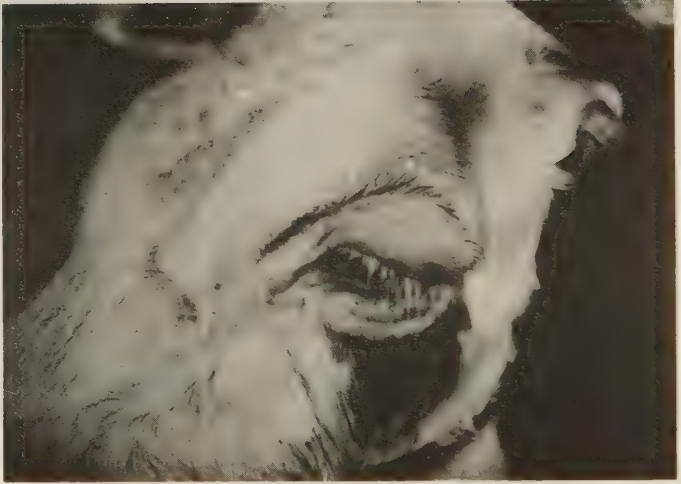


Abb. 9: Allgemeinreaktion bei einem Kontrolltier (K₇)
30 Minuten nach dem Intrakutantest an der
Schulterhaut (Ödem der Augenlider)

6.2.3. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Es wurden die von WEBER (1972) veröffentlichten Grundlagen verwendet.

Überprüft wurde folgender Parameter:

Dickenzunahme der Schulterhaut beim Intrakutantest
(6.2.2.4.; Tab. 4, 5 und 6):

Varianzanalyse,

t-Test: Vergleich zwischen immunisierten Tieren und
Kontrolltieren

Tukey-Test: Vergleich zwischen verschiedenen HCG-Dosen
und Kontrollösungen

7. DISKUSSION

Humanes Choriongonadotropin ist das bei der Therapie von Fortpflanzungsstörungen in der Veterinärmedizin am häufigsten verwendete gonadotrope Hormon. Da HCG für alle Haustierspezies eine körperfremde Substanz mit Glykoproteincharakter ist, wird schon lange die Frage diskutiert, ob dieses Hormon bei klinischer Anwendung als Antigen wirkt und bei einem therapeutischen Einsatz die Bildung spezifischer Antikörper auslöst.

Es liegen experimentelle Hinweise vor, daß sowohl das ganze Molekül, als auch die freien α - und β -Untereinheiten antigen wirken können (ROSS, 1977; MORI, 1970; MERZ et al., 1974). Die gezielte Antikörperproduktion bei Versuchstieren gelingt infolgedessen auch ohne besondere Schwierigkeiten. Der in den eigenen Versuchen bei den Kaninchen erzeugte Antikörperspiegel weist eine ähnliche Verlaufsform auf, wie er auch von anderen Autoren (RAO und SHAHANI, 1961; LUNENFELD et al., 1962) beobachtet wurde. Die wenigen in der Literatur vorliegenden Untersuchungen beim Rind weisen darauf hin, daß grundsätzlich auch bei dieser Spezies eine Antikörperproduktion nach Applikation von HCG stattfindet (NAKAHARA et al., 1961 a, b, c). Wegen der uneinheitlichen Versuchsbedingungen und der meist verwendeten hohen bis

extrem hohen HCG-Gaben können diese Ergebnisse nicht ohne Vorbehalt für praktisch-klinische Fragestellungen übernommen werden. Über die Auswirkungen von HCG nach therapeutischem Einsatz bei größeren Rinderkollektiven liegen bislang jedoch keine Untersuchungen vor.

Die Stärke der Immunreaktion gegen ein zugeführtes Antigen hängt nicht nur von der Art des Antigens ab, sondern sehr wesentlich auch von der Aufbereitung, der Dosis, der Verabreichungsform und -häufigkeit (SELL, 1977). Bei den in der Veterinärmedizin am häufigsten verwendeten HCG-Präparaten handelt es sich um wässrige oder ölige Lösungen oder Suspensionen des Wirkstoffes, die einmalig intramuskulär bzw. intravenös zu injizieren sind. Dies sind Verabreichungsformen, die erfahrungsgemäß bei schwachen Antigenen keine starke Immunantwort auslösen.

In den eigenen Untersuchungen konnte nach einmaliger HCG-Applikation in therapeutischen Dosen nur bei einem verschwindend geringen Prozentsatz der behandelten Tiere ein Antikörpertiter gefunden werden, der knapp über dem Grenzwert für unspezifische Reaktionen lag. Es ist unwahrscheinlich, daß so geringe Antikörpermengen in der Lage sind, bei einem erneuten therapeutischen Einsatz von HCG dessen erwünschte Wirkung zu neutralisieren oder immunpathogene Reaktionen hervorzurufen. In Einzelfällen,

z.B. bei genetisch besonders disponierten Individuen, nach Verunreinigung eines HCG-Präparates mit bestimmten Substanzen oder durch Hilfsstoffe, die bei der Auslösung einer Immunantwort mitwirken, kann eine Antikörperbildung sowie deren Folgen bei erneuter Injektion allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Die Immunisierungsversuche zeigten, daß allein durch mehrmalige Injektion bzw. durch Verdoppelung der zu Therapie-zwecken empfohlenen Dosis eine merkliche Antikörperproduktion nicht ausgelöst werden konnte. Selbst unter Zusatz eines speziellen, die Immunantwort steigernden Adjuvans (FAI) gelang es nicht, die Antikörpertiter erheblich zu steigern. Alle diese Ergebnisse bestätigen, daß HCG für das Rind ein schwaches Antigen ist, das normalerweise keine praktisch bedeutsame Antikörperbildung induziert. Eine im Vergleich zu diesen Immunisierungsversuchen häufigere Verabreichung von HCG in noch höherer Dosis wird unter Praxisbedingungen äußerst selten sein, da therapieresistente Tiere meist nach 2-3 maliger erfolgloser Behandlung aus wirtschaftlichen Gründen ausgemerzt werden.

Neben der spezifischen Wirkung von HCG muß in den aus biologischem Ausgangsmaterial hergestellten Präparaten - und das sind alle derzeit therapeutisch verwendeten

HCG-Präparate - stets auch, abhängig vom Reinigungsgrad, mit einer mehr oder weniger starken Wirkung von Begleit-substanzen des Ausgangsmaterials gerechnet werden. Außerdem können vom Hersteller zusätzlich pharmazeutische Hilfsstoffe wie Lösungsvermittler, Entschäumer u.a. zugesetzt sein, um ein Präparat in eine praxisgerechte Darreichungsform zu bringen. Diese Substanzen können ebenfalls als Antigene wirken. Die Injektion solcher Präparate löst unter Umständen die Bildung einer Vielzahl von Antikörpern aus.

Die in den eigenen Untersuchungen festgestellten Antikörpertiter bei den mit HCG vorbehandelten Tieren können daher nur unter Vorbehalt als HCG-spezifisch betrachtet werden. Die bei diesen Untersuchungen mit dem passiven Hämagglutinationstest ermittelten Titer lagen, unabhängig von der Vorbehandlung, maximal bei 1:32. Bei kritischer Beurteilung könnte man davon sprechen, daß Antikörper mit dieser Methode nicht nachweisbar waren. Dabei sind, wie erwähnt, sowohl die experimentell ermittelten Werte als auch die Titer aus den Feldversuchen in diese Überlegungen miteinbezogen.

Nach intradermaler Injektion von HCG in die Schulterhaut entwickelte sich bei den Kontrolltieren eine deutliche Hautanschwellung, die als Abwehrreaktion gegen das körper-

fremde Glykoprotein HCG und eventuelle Begleitstoffe des Präparates anzusehen ist. Die bei immunisierten Tieren auftretenden Hautreaktionen können infolgedessen nur teilweise auf eine Sensibilisierung des Tieres, d.h. also auf eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gegen das verwendete Präparat zurückgeführt werden. Die insgesamt jedoch deutlich stärkere Hautdickenzunahme bei den immunisierten Tieren läßt auf eine Sensibilisierung schließen. Folgt man dieser Ansicht, so kann beim Rind nach Applikation von HCG in therapeutischen Dosen, zumindest nach wiederholtem Einsatz, eine Immunreaktion im Sinne der anaphylaktischen Reaktion nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der intradermalen Injektion von HCG in die Schwanzfalte mit den bedeutend stärkeren Hautdickenzunahmen bei den mit HCG plus FAI immunisierten Tieren unterstützen diese Ansicht über eventuell mögliche anaphylaktische Reaktionen.

Zwischenfälle durch Allgemeinreaktionen - generalisiertem Schock - wie sie aus tierärztlichen Praxen nach Injektion von HCG-Präparaten berichtet wurden, traten bei 2 Tieren nach dem Intrakutantest an der Schulterhaut auf. Bei der hier gewählten Versuchsanordnung, mit gleichzeitiger Injektion von FAI und HCG an verschiedenen Stellen, war jedoch nicht abzuklären, welche

der injizierten Substanzen für die Auslösung dieser Reaktion verantwortlich war. Beim Kontrolltier kann eine spezifische Sensibilisierung gegen das injizierte HCG ausgeschlossen werden. Es handelt sich in diesem Fall mit größter Wahrscheinlichkeit um eine anaphylaktoide Reaktion, die nicht durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion ausgelöst wurde. Das vorimmunisierte Tier hatte bei keiner der zuvor erfolgten HCG-Verabreichungen, einschließlich des Intrakutantestes mit HCG in die Schwanzfalte, Allgemeinreaktionen gezeigt. Eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion gegen HCG ist als Ursache für die Allgemeinreaktion jedoch grundsätzlich nicht auszuschließen. Da bei beiden Tieren klinisch analoge Phänomene beobachtet wurden, ist anzunehmen, daß es sich auch bei dem vorimmunisierten Tier um eine anaphylaktoide Erkrankung handelte. Darüberhinaus könnte in Betracht gezogen werden, daß in beiden Fällen nicht faßbare Begleitstoffe antigen wirksam waren und die klinischen Symptome als allergische Erkrankungen interpretiert werden müßten.

Eine Zusammenfassung der experimentellen Versuche und der Feldstudien zu der Fragestellung von Immunreaktionen nach HCG-Applikation beim Rind in therapeutischen Dosen ergibt folgende Schlußfolgerungen:

Mit Hilfe der passiven Hämagglutination war keine humora-

le Antikörperbildung zu belegen. Dies traf auch für alle Fälle mit mehrfach wiederholten Injektionen von HCG zu, wie sie unter praktischen Verhältnissen, wenn überhaupt, sehr selten vorkommen. Die Gefahr durch Antigen-Antikörper-Reaktionen eine Allergie oder eine Neutralisation des Hormones zu erhalten, scheint gering zu sein. Ähnliche Reaktionen durch eventuelle Begleitstoffe der handelsüblichen HCG-Präparate bleiben dabei unberücksichtigt. Andererseits zeigen die lokalen Effekte der Intrakutantests und die generalisierten Reaktionen, die entweder anaphylaktoid durch das HCG oder allergisch durch Begleitstoffe bedingt sein könnten, daß ausnahmsweise auch bei praxisüblicher Dosierung von HCG-Präparaten unerwünschte Nebenwirkungen auftreten können. Die Gefahr solcher Nebenwirkungen ist verstärkt, wenn die Tiere vorbehandelt sind oder wenn irrtümlich HCG intrakutan appliziert wird. Nach den hier durchgeführten Versuchen dürfte dabei insbesondere die Applikationsart von entscheidender Bedeutung sein.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Beim Rind wurde die Antikörperbildung nach einmaliger (intravenöser) und wiederholter (intramuskulärer und intravenöser) Injektion von HCG-Präparaten untersucht. Der Antikörpertiter im Blutserum wurde mit Hilfe der passiven Hämagglutination bestimmt. Außerdem wurden Intrakutantests in der Schwanzfalte und an der Schulterhaut durchgeführt.

Weder nach einmaliger noch nach wiederholter Injektion der HCG-Präparate traten Antikörpertiter von über 1:32 auf. Die intradermale Injektion von HCG in die Schwanzfalte verursachte bei immunisierten Tieren und Kontrolltieren eine im allgemeinen geringfügige Dickenzunahme der Hautfalte. Auffallend stark reagierten nur die beiden immunisierten Tiere, die zuvor eine HCG-Injektion unter Zusatz von Freund's Adjuvans erhalten hatten. Die intradermale Injektion von HCG in die Schulterhaut verursachte sowohl bei den vorbehandelten Tieren als auch bei den Kontrolltieren eine signifikante Zunahme der Hautdicke.

Bei 2 von 10 Tieren traten kurz nach einem Intrakutantest Allgemeinstörungen auf, bei denen es sich wahrscheinlich um anaphylaktoide Reaktionen gehandelt hat. Bei der intramuskulären und intravenösen Injektion von HCG waren derartige Nebenwirkungen in keinem Fall zu beobachten.

SUMMARY

In the present study the antibody formation after single (intravenous) and repeated (intramuscular or intravenous) injections of HCG preparations was examined in cattle. The antibody titer in blood serum was determined by passive haemagglutination test. In addition intracutaneous tests were performed at the caudal fold and the skin of the shoulder.

Neither single nor repeated injections of HCG preparations resulted in an antibody titer higher than 1:32. Intradermal injections of HCG into the caudal fold brought about a distinct increase in the cutaneous thickness of control as well as pretreated animals. A pronounced reaction was only elicited from animals which had received a single additional injection of HCG combined with Freund's adjuvant (incomplete) before the intracutaneous tests were performed. The intradermal injections of HCG into the shoulder caused a significant increase in skin thickness of both pretreated and control animals. However the increase of the skin thickness in pretreated animals (5,6 mm) was higher than in the controls (2,6 mm; difference to controls $P \leq 0.01$, t-test).

Shortly after the intracutaneous test two animals showed general, probable anaphylactoid reactions. None of the intramuscular or intravenous injections of HCG gave rise to similar side effects.

9. LITERATURVERZEICHNIS

- AL-KAWAWI, A.A., M.L. Immunization of dogs against
HOPWOOD, M.H. PINEDA human chorionic gonadotropin
and L.C. FAULKNER Am.J.Vet.Res. 35, 261
(1974)
- ASCHHEIM, S. und B. Hypophysenvorderlappenhormon
ZONDEK und Ovarialhormon im Harn
(1927) von Schwangeren
Klin.Wochenschr. 6, 1322
- BAHL, O.P. Human chorionic gonadotropin
(1969) II. Nature of the carbohydrate
units
J.Biol.Chem. 244, 575
- BATCHELOR, F.R., J.M. A penicilloylated protein im-
DEWDNEY, J.G. FEINBERG purity as a source of allergy
and R.D. WESTON to benzylpenicillin and 6-
(1967) aminopenicillanic acid
Lancet 1, 1175
- BERCHTHOLD, M., P. RÜSCH Ovarielle Veränderungen nach
und R. THUN GnRH-Applikation bei Kühen
(1978) mit normalen Ovarfunktionen
Schweiz.Arch.Tierheilk. 120,
377

- BIRKEN, S. and R.E. CANFIELD
(1978) Structural and immunochemical properties of human chorionic gonadotropin
In: Structure and function of the gonadotropins Ed. by K.W. McKerns
Plenum Press, New York and London
- BRAUNSTEIN, G.D., J. RASOR and D. ADLER
(1976) Serum human chorionic gonadotropin levels throughout normal pregnancy
Am.J.Obstet.Gynecol. 126, 677
- BRODY, S. and G. CARLSTRÖM
(1961) Clinical application of a serological method for the determination of human chorionic gonadotropin
Nature (Lond.) 189, 841
- BUDDECKE, E.
(1971) Grundriß der Biochemie
Walter de Gruyter & Co., Berlin
- BUSCHMANN, H.
(1970) Reifung und Alterung der immunologischen Kompetenz
Tierärztl. Umschau 83, 525

- BUSCHMANN, H.
(1973)
Der Einfluß des Antigens auf
die Stärke und Qualität der
Immunantwort
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.
86, 81
- BUSCHMANN, H.
(1974)
Der Einfluß des Geschlechts
auf Immunität und Infektions-
resistenz
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr.
87, 194
- BUTTERWORTH, M., B.
McCLELLAN and M. ALLAN-
SMITH
(1967)
Influence of sex on immuno-
globulin levels
Nature 214, 1224
- COLE, H.H., C. HAMBURGER
and A. NEIMANN-SØRENSEN
(1957)
Studies on antigenadotrophins
with emphasis on their for-
mation in cattle
Acta Endocr. 26, 286
- COLLIP, J.B. and E.M.
ANDERSON
(1934)
Serum inhibitory to the
thyreotropic hormone
Lancet 226, 76

- DICZFALUSY, E. and P. TROEN
(1961) Endocrine functions of the placenta
Vitamins Hormones 19, 229
- DÖCKE, F.
(1975) Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- DOLAIS-KITABGI, J., M. LABURTHE and G. ROSSELIN
(1974) Immunological specificity of the β subunit of the human chorionic gonadotropin (HCG)
Horm.Metab.Res. 6, 527
- DONALDSON, L.E. and W. HANSEL
(1965) Prolongation of life span of the bovine corpus luteum by single injections of bovine luteinizing hormone
J.Dairy Sci. 48, 903
- DONINI, S., I. d'ALESSIO and P. DONINI
(1975) Subunits of human chorionic gonadotrophin: immunological and biological studies
Acta Endocr. 79, 749
- EDWARDS, R.G. and R.E. FOWLER
(1959) Fetal mortality in adult mice after superovulation with gonadotrophins
J.exp.Zool. 141, 299

EDWARDS, R.G. and
R.E. FOWLER
(1960)

Superovulation treatment of
adult mice; their subsequent
natural fertility and response
to further treatment
J.Endocrinol. (Lond.) 21, 147

von FELLENBERG, R.
(1978)

Kompndium der allgemeinen
Immunologie
Verlag Paul Parey, Berlin und
Hamburg

FRIESEN, H.G.
(1973)

Placental protein and polypep-
tide hormones
In: Handbook of Physiology,
Section 7, Endocrinology, Vol. II
Female Reproductive System,
Part. 2, 295
The Williams and Wilkins Company,
Baltimore, Maryland

GARVERICK, H.A., D.J.
KESLER, T.C. CANTLEY,
R.G. ELMORE, R.S. YOUNG-
QUIST and C.J. BIERSchWAL
(1976)

Hormone response of dairy cows
with ovarian cysts after treat-
ment with HCG or GnRH
Theriogenology 6, 413

- GESCHWIND, J.J.
(1963) The chemistry and immunology
of gonadotropins
In: Gonadotropins ed. by H.H.
Cole
W.H. Freeman and Company, San
Francisco and London
- GEY, G.O., G.E. SEEGER
and L.M. HELLMAN
(1938) The production of a gonadotro-
phic substance (prolan) by
placental cells in tissue culture
Science 88, 306
- GLASS, R.H. and A. MROUEH
(1967) Pregnancy in the rabbit following
immunization with human chorionic
gonadotropin
Am.J.Obstet. & Gynec. 97, 1082
- GOVERDE, B.C., F.J.N.
VEENKAMP and J.D.H. HOMAN
(1968) Studies on human chorionic
gonadotrophin
Acta Endocr. 59, 105
- GRAFF, R.J., M.A. LAPPE
and G.D. SNELL
(1969) The influence of the gonads and
adrenal glands on the immune
response to skin grafts
Transplantation 7, 105

- GREENWALD, G.S. Development of ovulatory refrac-
(1970) toriness in the rabbit to cyclic
 injections of human chorionic
 gonadotropin
 Fert.Ster. 21, 163
- GÜNZLER, O. und E. HUBER Einsatz von Hormonen zur Propy-
(1967) laxe und Therapie der Sterilität
 des Rindes
 Schweiz.Arch.Tierheilk. 109, 611
- HAFEZ, E.S.E. Effects of overcrowding in uterus
(1964) on implantation and fetal develop-
 ment in the rabbit
 J.exp.Zool. 156, 269
- van HALL, E.V., J.L. Immunological and biological
VAITUKAITIS, G.T. ROSS, activity of HCG following
J.W. HICKMAN and G. ASH- progressive desialylation
WELL Endocrinology 88, 456
(1971)
- HIERHOLZER, K., D. NEUBERT Endokrinologie II
und F. NEUMANN Urban & Schwarzenberg, München -
(1977) Wien - Baltimore

- KATAOKA, T., T. NAKAHARA, Y. KANEDA and M. YAMAUCHI
(1965) Immunoassay of anti-hormone against human chorionic gonadotropin in bovine serum
Bull.Nat.Inst.Anim.Hlth. 50, 15
- KONGSHARN, P.A.L. and J.Q. BLISS
(1969) Sex differences in survival of H-2 incompatible skin grafts in mice treated with anti-thymocyte serum
Nature 226, 451
- KORNDÖRFER, L. und A. SCHMID-LINDNER
(1975) Vergleichende Behandlungsversuche mit HCG in wässriger Lösung und öligiger Suspension bei Ovarialzysten des Rindes
Zuchthygiene 10, 5
- LAND, R.B. and A. McLAREN
(1967) The response of female mice to repeated injections of human chorionic gonadotrophin
J.Reprod.Fert. 13, 321
- LEATHEN, J.H.
(1944) The antihormon problem in clinical endocrine therapy
J.Clin.Endocrinol. 4, 500

- LEATHEN, J.H.
(1947) Further studies on antigonadotrophin formation following gonadotrophic hormone administration
Am.J.Physiol. 148, 700
- LEATHEN, J.H. and J.T. BRADBURY
(1949) Antihormone formation during chorionic gonadotropin therapy
J.Clin.Endocrinol. 9, 384
- LEATHEN, J.H. and A.E. RAKOFF
(1946) The problem of anti-gonadotropins in clinical therapy
Endocrinology 39, 73
- LEZNOFF, A. and B.A. DAVIS
(1963) The cytological localization of human chorionic gonadotropin
Can.J.Biochem. 41, 2517
- LIN, T.P. and D.W. BAILEY
(1965) Difference between two inbred strains of mice in ovulatory responses to repeated administration of gonadotrophins
J.Reprod.Fert. 10, 253

- LUNENFELD, B., C. ISERSKY and M.C. SHELESNYAK
(1962) Immunologic studies on gonadotropins. I. immunogenic properties and immunologic characterization of human chorionic gonadotropin preparations (HCG) and their homologous antisera
J.Clin.Endocrinol.Metab. 22, 555
- McDONALD, L.E.
(1969) Veterinary endocrinology and reproduction
Lea & Febiger, Philadelphia
- McKEAN, C.M.
(1960) Preparation and use of antisera to human chorionic gonadotropin
Am.J.Obstet.Gynecol. 80, 596
- MASON, R., J.M. MARSH and K. SAVARD
(1962) An action of gonadotropin in vitro
J.Biol.Chem. 237, 1801
- MATSUURA, S., H.-C. CHEN and G.D. HODGEN
(1978) Antibodies to the carboxyl-terminal fragment of human chorionic gonadotropin β -subunit: characterization of antibody recognition sites using synthetic peptide analogues
Biochemistry 17, 575

- MAURER, R.R., W.L. HUNT and R.H. FOOTE
(1968) Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in Dutch-belted rabbits
J.Reprod.Fert. 15, 93
- MAYR, A. und B. BIBRACK
(1969) Antibiotikaallergien beim Tier
Berl.Münch.Tierärztl.Wschr. 82, 182
- MAYR, A. und B. BIBRACK
(1970) Arzneimittelallergien beim Rind
Tierärztl.Wschr. 83, 439
- MERZ, W.E., U. HILGENFELDT, M. DÖRNER and R. BROSSMER
(1974) Biological, immunological and physical investigations on human chorionic gonadotropin
Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 1035
- MICHELMANN, H.W. und S.PAUFLER
(1974) Untersuchungen über die Ovulationsauslösung beim Kaninchen
Zuchthygiene 9, 116
- MIDGLEY, A.R. and G.B. PIERCE
(1962) Immunohistochemical localization of human chorionic gonadotropin
J.Exptl.Med. 115, 289

- MORGAN, F.J. and R.E. CANFIELD (1971) Nature of the subunits of human chorionic gonadotropin
Endocrinology 88, 1045
- MORGAN, F.J., S. KAMMERMAN and R.E. CANFIELD (1973) Chemistry of human chorionic gonadotrophin
In: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology Vol. II Female Reproductive System 2, 311
The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland
- MORI, K.F. (1970) Antigenic structure of human gonadotropins: importance of protein moiety to the antigenic structure of human chorionic gonadotropin
Endocrinology 86, 97
- MORRIS, L.M., E. GONZALEZ-PADILLA, G.D. NISWENDER and J.N. WILTBANK (1976) Peripheral progesterone levels in pregnant and non-pregnant heifers following use of HCG
Theriogenology 6, 367
- NAKAHARA, T., M. YAMAUCHI and T. KATAOKA (1961a) Studies on the antihormone against human chorionic gonadotrophin (Anti-HCG) in cattle
I. Experimental formation of the antihormone against human chorionic gonadotrophin in cattle
Jap.J.Animal.Reprod. 7, 27

NAKAHARA, T., M. YAMA-
UCHI and T.KATAOKA
(1961b)

Studies on the antihormone against
human chorionic gonadotrophin
(Anti-HCG) in cattle
II. Formation of the Anti-HCG
in cattle with cystic ovaries
following repeated administrations
of HCG
Jap.J.Animal.Reprod. 7, 32

NAKAHARA, T., M. YAMA-
UCHI, T. KATAOKA, Y.
MARUYAMA and Y. KANEDA
(1961c)

Studies on the antihormone against
human chorionic gonadotrophin
(Anti-HCG) in cattle
III. Hormonal treatment of
refractory ovarian follicle
cysts in cattle by injecting
HCG directly into the cysts
Jap.J.Animal.Reprod. 7, 123

NAKAHARA, T., M. YAMA-
UCHI, T. KATAOKA and
Y. KANEDA
(1962)

Studies on the antihormone
against human chorionic gona-
dotrophin (Anti-HCG) in cattle
IV. Reformation of the Anti-HCG
in cattle
Jap.J.Animal.Reprod. 7, 137

- NAKAHARA, T., Y. KANEDA,
T. KATAOKA and M. YAMA-
UCHI
(1964) Studies on the antihormone
against human chorionic gona-
dotrophin (Anti-HCG) in cattle
V. Anti-HCG formation following
injection with inactivated HCG
Jap.J.Animal.Reprod. 9, 133
- NAKAHARA, T., Y. KANEDA,
T. KATAOKA and M. YAMA-
UCHI
(1965) Studies on the antihormone
against pregnant mare serum
gonadotrophin (Anti-PMS) in
cattle
Jap.J.Animal.Reprod. 10, 128
- NIXON, W.E., W.W. TULLNER, P.L. RAYFORD and G.T. ROSS
(1971) Similarity of antigenic deter-
minants in pituitary and chorio-
nic gonadotropins from primates
Endocrinology 88, 702
- PARKES, A.S.
(1942) Induction of superovulation
and superfecundation in rabbits
Nature 3, 268
- PATILLO, R.A., G.O. GEY,
E. DELFS, W.Y. HUANG,
L. HAUSE, J. GARANCIS,
M. KNOTH, J. AMATRUDA,
J. BERTINO, H.G. FRIESEN
and R.F. MATTINGLY
(1971) The hormone-synthesizing tropho-
plastic cell in vitro: a model
for cancer research and placen-
tal hormone synthesis
Ann. NY Acad.Sci. 172, 288

- FIGON, H., M.T. CLEGG The formation of antigonadotrophin in sheep and its effect on the endocrines and reproductive system
and H.H. COLE
(1960)
Acta Endocr. 35, 253
- RAO, S.S. and S.K. SHAHANI The antigenicity of human chorionic gonadotrophin
(1961)
Immunology 4, 1
- REEL, J.R., R.R. HUMPHREY Luteinizing hormone-releasing hormone versus human chorionic gonadotropin: differential effect on the development of ovulatory refractoriness and antibodies
and W.C. DERMODY
(1976)
Fert.Ster. 27, 59
- ROLLE, M. und A. MAYR Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
(1978)
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- ROSS, G.T. Clinical relevance of research on the structure of human chorionic gonadotropin
(1977)
Am.J.Obstet.Gynecol. 129, 795

- ROWLEY, M.J. and J.K. Measurement of antibody-pro-
MacKAY ducing capacity in man
(1969) Clin.exp.Immunol. 5, 407
- SAVARD, K., J.M. MARSH Gonadotropins and ovarian
and B.F. RICE steroidogenesis
(1965) Recent Prog.Horm.Res. 21, 285
- SCHAMS, D., Ch. MENZER, Some studies on pregnant mare
E. SCHALLENBERGER, B. serum gonadotrophin (PMSG) and
HOFFMANN, J. HAHN and on endocrine responses after
R. HAHN application for superovulation
(1978) in cattle
In: Control of reproduction in
the cow ed. by J.R. Sreenan
Martinus Nijhoff-The Hague-
Boston-London
- SCHOMBERG, D.W., S.P. Effects of bovine luteinizing
COUDERT and R.V. SHORT hormone and human chorionic
(1967) gonadotrophin on the bovine
corpus luteum in vivo
J.Reprod.Fert. 14, 277

- SCHUURS, A.H.W.M.,
E. de JAGER and J.D.H.
HOMAN
(1968)
Studies on human chorionic
gonadotrophin
III. Immunochemical characterisation
Acta Endocr. 59, 120
- SELL, S.
(1977)
Immunologie, Immunpathologie
und Immunität
Verlag Chemie, Weinheim - New York
- SHERWOOD, O.D. and W.H.
McSHAN
(1977)
Gonadotropins
In: Reproduction in domestic
animals ed. by H.H. Cole and
P.T. Cupps
Acad. Press New York - San Francisco - London
- SHOME, B. and A.F.
PARLOW
(1973)
The primary structure of the
hormone-specific, beta subunit
of human pituitary luteinizing
hormone (hLH)
J.Clin.Endocrinol.Metab. 36, 618
- STEFFEN, C.
(1968)
Allgemeine und experimentelle
Immunologie und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- STOLLA, R.
(1976) Zyklussteuerung beim Schwein
unter experimentellen Bedin-
gungen mit dem Gestagen
Sandoz 45.249
Zuchthygiene 11, 86
- STIDL, G.
(1979) Untersuchungen über Zyklussteue-
rung, Superovulation, Embryo-
gewinnung, -kultivierung und
-konservierung beim Schwein
Diss.Med.Vet. München
- SWAMINATHAN, N. and
O.P. BAHL
(1970) Dissociation and recombination of
the subunits of human chorionic
gonadotropin
Biochem.Biophys.Res.Comm. 40, 422
- TAYMOR, M.L., D.A. GOSS
and A. BUYTENDORP
(1963) Immunologic cross-reaction bet-
ween luteinizing hormone and
human chorionic gonadotropin
Fert.Ster. 14, 603
- TENNEY, B. and F. PARKER
(1937) Some observations of the gona-
dotrophic hormone of pregnancy
Endocrinology 21, 687
- TIZARD, I.R.
(1977) An introduction to veterinary
immunology
W.B. Saunders Company, Philadelph
London - Toronto

- TURNER, C.D. and J.T. General Endocrinology
BAGNARA W.B. Saunders Company
(1971) Philadelphia - London - Toronto
- TWOMBLY, G.H. Studies of the nature of
(1936) anti-gonadotropic substances
Endocrinology 20, 311
- TYREY, L., S. HANDWERGER Human chorionic gonadotropin (HCG)
and L.M. SHERWOOD In: Methods of Hormone Radio-
(1974) immunoassay ed. by Jaffe, B.M.
and H.R. Behrman
Acad.Press, New York, San Fran-
cisco, London
- VAITIKAITIS, J.L., G.T. Immunologic and biologic behavior
ROSS and L.E. REICHERT of hCG and bovine LH subunit
(1973) hybrids
Endocrinology 92, 411
- VEENHUIZEN, E.L., J.F. Corpus luteum response to 6-
WAGNER and L.V. TONKINSON chloro Δ^6 -17 acetoxyprogesterone
(1972) and HCG in the cow
Biol.Reprod. 6, 270
- VORLAENDER, K.O. Praxis der Immunologie. Grund-
(1976) lagen - Methoden - Klinik
Georg Thieme Verlag, Stuttgart

- WEBER, E. Grundriß der biologischen Sta-
(1972) tistik
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- WEBER, J. Histochemical studies of the
(1963) production of gonadotrophin
in the placenta and fetal
membranes
Acta Obstet.Gynecol.Scand.Suppl.
42, 6
- WIDE, L. and C.A. GEMZELL An immunological pregnancy test
(1960) Acta Endocr. 35, 261
- WILLETT, E.L., P.J. BUCK- Refractoriness of cows repeatedly
NER and W.H. McSHAN superovulated with gonadotrophins
(1953) J.Dairy Sci. 36, 1083
- WILTBANK, J.N., J.A. ROTH- Effect of human chorionic gona-
LISBERGER and D.R. ZIMMER- dotrophin on maintenance of the
MAN corpus luteum and embryonic
(1961) survival in the cow
J.Anim.Sci. 20, 827
- YAMAUCHI, M. Antihormone against gonadotro-
(1970) pin in cattle
Nat.Inst.Anim.Hlth.Quart. 10,
Suppl. 149

LEBENS LAUF

Am 15. Juli 1940 wurde ich, Hang-Poung Fung, als zweiter Sohn des Dr. med. Fung Kai-Jone und seiner Ehefrau Ting Schau-Me, in Kaung Chu geboren.

Von 1951 bis 1956 besuchte ich die Chin-Schue Primary School in Tainan/Taiwan, Republik China, von 1956 bis 1959 die Chia-I Middle School in Chia-I/Taiwan, von 1959 bis 1961 die City High School in Tainan. Dort bestand ich im Juni 1961 das Abitur.

1961 bis 1962 leistete ich meinen Militärdienst.

1963/64 widmete ich mich der Vorbereitung für die Aufnahmeprüfung an der National Taiwan University, Taipei.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich an der National Taiwan University in Taipei das Studium der Tiermedizin. Im Juni 1969 bestand ich die Abschlußprüfung und erhielt im Oktober 1969 die Bestallung als Tierarzt. Seither bin ich an der Universitätstierklinik des Department of Veterinary Medicine der National Taiwan University auf dem Gebiet Gynäkologie, Obstetrik und Andrologie tätig.

Im Juni 1971 heiratete ich Fräulein Chu Schau-Ün.

Seit April 1977 arbeite ich an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, Abteilung für Andrologie und Künstliche Besamung, an vorliegender Dissertation.

Herrn Professor Dr. W. Leidl und Herrn Professor Dr. H. Buschmann möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung sehr herzlich danken.

Die Blutproben des Feldversuches wurden im Rahmen der Tätigkeit der Ambulatorischen Tierklinik gewonnen. Für die freundliche Hilfe bedanke ich mich bei Herrn Dr. W. Schefels, Herrn Dr. A. Klenner und Herrn Ch. Hundschell.

Mein Dank gilt außerdem allen Angehörigen des Lehrstuhles, die mich bei dieser Arbeit unterstützten, insbesondere Frl. G. Stidl und Frl. Dr. B. Himmer.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frl. B. Steinert für die Mithilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes.

